

Formación de embriones somáticos de *Pterogyne nitens* Tul.

Maritza Vacca Molina^{1*}, Elvia Nieves¹, Zulma Avilés¹, Roberto H. Martínez¹, Anabel Barbosa Pons¹

¹Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Sedes Salta y Metán, Rosario de la Frontera. Avda Bolivia 5150. 4400. Salta. Argentina.

RESUMEN

En el noroeste argentino, en la Selva Pedemontana (Selva de las Yungas), debido al uso extractivo no planificado, algunas especies se encuentran en estado vulnerable. La Tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul. Ex Benth.), es una especie que se encuentra bajo riesgo/casi amenazada. La embriogénesis somática en plantas, representa una alternativa para la producción a gran escala de individuos élites. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y su concentración, en la formación de embriones somáticos de tipa colorada. Se aislaron masas proembriogénicas obtenidas en la fase de formación de callos en medio de cultivo MS con TDZ, 2,4-D y ANA y se transfirieron a medios de cultivo de formación de embriones. Se realizaron dos ensayos para evaluar: 1) el efecto de Kin y BAP en la morfología e histología de las estructuras formadas 2) el efecto de cuatro concentraciones de BAP y un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, en el aumento de la masa del callo y la formación de embriones somáticos. Las evaluaciones se realizaron a los 45 días de cultivo. Se observaron distintas etapas de desarrollo embrionario: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Así también, embriones fusionados, con un número anormal de cotiledones o cotiledones soldados. Se registró embriogénesis secundaria. Las estructuras embriogénicas obtenidas de la formación de callos con TDZ se multiplicaron adecuadamente en un medio de cultivo con 4.40 µM y 13.20 µM de BAP y se obtuvieron embriones bien diferenciados.

Palabras clave: embriogénesis somática, reguladores del crecimiento, tipa colorada

Somatic embryos formation in *Pterogyne nitens* Tul.

ABSTRACT

In northwestern Argentina, in the Yungas Forest (Pedemontian Forest), some species are vulnerable due to unplanned extractive practices. The Tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul. ex Benth.) is one such species, considered at risk/near threatened. Somatic embryogenesis in plants represents an alternative for the large-scale production of elite individuals. This study aimed to evaluate the effect of growth regulators and their concentration on the formation of somatic embryos in Tipa colorada. Proembryogenic masses obtained during the callus formation phase were isolated in MS culture medium containing TDZ, 2,4-D, and NAA and transferred to embryo formation culture media. Two assays were performed to evaluate: 1) the effect of Kin and BAP on the morphology and histology of the formed structures; and 2) the effect of four concentrations of BAP and a culture medium without growth regulators on callus mass increase and somatic embryo formation. Evaluations were performed after 45 days of culture. Different stages of embryonic development were observed: globular, heart, torpedo, and

Editora:

Yelenys Alvarado-Capó
Instituto de
Biotecnología de las
Plantas, Universidad
Central Marta Abreu
de Las Villas.

*Correspondencia:

e-mail:
maritzavaccamolina
@gmail.com

Recibido: 13-04-2023

Aceptado: 23-12-2023

Copyright:

Este es un artículo de
acceso abierto
distribuido bajo una
Licencia Creative
Commons Atribución-
NoComercial 4.0
Internacional (CC BY-NC
4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido
su uso, distribución o
reproducción citando la
fuente original y los
autores.

cotyledonary. Fused embryos, embryos with an abnormal number of cotyledons, and fused cotyledons were also observed. Secondary embryogenesis was recorded. The embryogenic structures obtained from callus formation with TDZ multiplied adequately in a culture medium with 4.40 μM and 13.20 μM of BAP, and well-differentiated embryos were obtained.

Keywords: plant growth regulators, somatic embryogenesis, tipa colorada

INTRODUCCIÓN

La población de la tierra está aumentando considerablemente, ello conlleva una importante presión sobre los recursos naturales. El sector de la producción forestal se encuentra sometido a una demanda creciente de productos, lo cual conduce a una fuerte deforestación en diversas áreas del planeta. En Argentina, en la Selva de las Yungas, la región de la Selva Pedemontana es el piso altitudinal de clasificación vegetal con mayor número de especies de valor maderable. Las especies más buscadas en este piso son: Roble (*Amburana cearensis* AC Smith), Cedro Orán (*Cedrella angustifolia* Sessé & Moc. ex DC.), Palo Blanco (*Callycophyllum multiflorum* Griseb.), Palo Amarillo (*Phyllostylon rhamnoides* (Pois.) Taub.), Afata (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud.), Urundel (*Astronium urundeuva* M.Allemão), Tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul. Ex Benth.), Cebil Moro (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan), etc. Debido al uso extractivo no planificado, algunas de estas especies están en peligro de extinción o amenazadas.

La tipa colorada, en los últimos años ha sido catalogada por la IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*) como bajo riesgo/casi amenazada (IUCN, 2015). Perteneciente a la familia Leguminosae, es una especie de distribución geográfica restringida, con estado de conservación regular, medianamente competitiva bajo condiciones de escasa iluminación y elevada competencia radicular, con buena regeneración natural cuando se encuentra en áreas abiertas. En la región del noroeste argentino, la reforestación con especies nativas, es una práctica casi inexistente y todas las experiencias están centradas en la plantación de especies exóticas de rápido crecimiento, lo que se traduce en una pérdida de biodiversidad. Por ello, es prioritario desarrollar nuevas técnicas que complementen los métodos tradicionales de propagación, las que deben ser eficientes en la producción de plantines para su utilización en planes de reforestación, en sistemas silvoagrícolas.

La embriogénesis somática (ES) es una técnica con una amplia posibilidad de aplicaciones, ya sea en el mejoramiento genético de especies forestales, la propagación de especies recalcitrantes o de alto valor en peligro de extinción (Pijut *et al.*, 2011).

Mediante la embriogénesis somática se pueden obtener embriones a partir de células somáticas desde cualquier tipo de tejido (no sexual), lo que hace más eficiente la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión y sus altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies donde se informa una ES eficiente y que permita el uso repetible del método para

beneficio biotecnológico (Quiroz *et al.*, 2006). La ES incluye la inducción, formación, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión en plántulas; cada una depende del genotipo de la planta progenitora, del tipo y del estado fisiológico del explante, de los reguladores de crecimiento y de las condiciones del cultivo, entre otros factores (Corredoira *et al.*, 2012; Corredoira *et al.*, 2015). Existen dos tipos de ES *in vitro*: directa e indirecta. Por su parte, la vía directa involucra la formación de embriones somáticos en una parte del explante, a partir de células embriogénicas predeterminadas, sin la formación previa de callo. La indirecta implica una fase intermedia de callo, en la que las células cambian su competencia genética a la expresión embriogénica y se induce la formación de proembriones, los cuales evolucionarán a embriones somáticos al ser transferidos a un medio de cultivo con menores concentraciones de reguladores de crecimiento (von Arnold *et al.*, 2002).

La ES por su potencial para la propagación masiva, ha sido utilizada para la propagación de varias especies forestales, industriales, medicinales, entre otras. En tipa colorada se lograron inducir exitosamente masas proembriogénicas desde explantes cotiledonares (Vacca *et al.*, 2014). Sin embargo, se requiere continuar el proceso de embriogénesis somática y para ello el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y su concentración, en la formación de embriones somáticos de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

A partir de la germinación *in vitro* de semillas maduras de tipa colorada, recolectadas en la localidad de Orán, Salta, Argentina (23°08'S 64°20'O), se obtuvieron plantas *in vitro*, de las que se extrajeron explantes cotiledonares.

Formación de callos

Los explantes cotiledonares, se colocaron en medios de cultivo para la formación de callos con estructuras embriogénicas. Se formularon cuatro tratamientos sobre la base salina del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) enriquecido con 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) en concentraciones de 107.41 y 180.99 μM y ANA (ácido naftalenacético) en concentración de 80.56 μM , según protocolo descrito por Vacca *et al.* (2014). Al cuarto tratamiento se adicionó TDZ (Thidiazuron) (Sigma®) en concentración de 27.24 μM . Todos los medios de cultivo contenían 6 g l⁻¹ de agar (Sigma®), 0.1 g l⁻¹ de mio-inositol, 0.5 g l⁻¹ de caseína hidrolizada (Sigma®), 30 g l⁻¹ de sacarosa y vitaminas de MS.

Condiciones de cultivo

El pH en todos los medios de cultivo se ajustó a 7, por medio de la adición de HCl o NaOH, luego fueron esterilizados en autoclave a 121°C, 1.2 kg cm⁻² de presión, durante 20 minutos. Para la formación de callos, los cultivos se incubaron en cámaras de cultivo, en oscuridad a 25 ± 2°C, durante 20 días. Se realizaron subcultivos cada 10 días.

Bajo condiciones asépticas, a partir de callos con estructuras embriogénicas, se aislaron masas proembriogénicas (MPes), que se utilizaron como fuente de explante para la evaluación del efecto de los medios de cultivo en la formación de embriones.

Formación de embriones somáticos

Se evaluaron siete medios de cultivo de formación de embriones somáticos, denominados PES 1 al 7, a los que se le adicionó Kinetina (Kin) a 2.32 µM (PES 1) y 6-bencilaminopurina (BAP) en distintas concentraciones (PES 2 al 6), también se generó un tratamiento sin reguladores de crecimiento (PES 7) (Tabla 1). Los medios de cultivo se formularon sobre la base de MS al 100% de su concentración salina, solidificado con 6 g l⁻¹ de agar (Sigma®), con 0.1 g l⁻¹ de mio-inositol, vitaminas de MS y 30 g l⁻¹ de sacarosa. La esterilización se realizó según descripción previa, los cultivos se incubaron en cámara de crecimiento a 25 ± 2°C, bajo iluminación fluorescente de 25 µmol m⁻² s⁻¹ con un fotoperiodo de 16 horas, con subcultivos cada 10 días.

Tabla 1. Medios de cultivo para la formación de embriones somáticos de *Pterogyne nitens* Tul. Reguladores de crecimiento y concentraciones utilizadas.

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (µM)	
	Kin	BAP
PES 1	2.32	-
PES 2	-	2.22
PES 3	-	4.40
PES 4	-	13.20
PES 5	-	26.4
PES 6	-	39.6
PES 7	-	-

Con las MPes obtenidas mediante la formación de callos, sobre los siete medios de cultivo, se realizaron dos ensayos:

Ensayo 1

Las MPes, obtenidas de la formación de callos con 2,4-D, ANA y TDZ, fueron transferidas a los medios de cultivo PES 1 al 7 y se mantuvieron durante 45 días. Al finalizar este tiempo de incubación, se analizó la morfología e histología de las estructuras formadas. Para la histología, las muestras fueron fijadas en FAA (paraformaldehído al 40%, ácido acético glacial y etanol al 96%) (1:1:9)(v/v/v) y deshidratadas. Se realizaron cortes de secciones de 5 µm de espesor con micrótopo rotativo marca Microm HM 310, los que se tiñeron con Safranina-Fast-Green y posteriormente fueron observados y fotografiados bajo un microscopio Carl Zeiss acoplado a un sistema de captura de imágenes.

Ensayo 2

Las MPes obtenidas de la formación de callos con 2,4-D y TDZ, fueron transferidas, a los medios de cultivo PES 3, 4, 5, 6 y 7 (Tabla 1) y se mantuvieron

durante 45 días. Al final del periodo de cultivo, se evaluaron las siguientes variables:

1) Aumento de la masa celular del callo

Se establecieron tres categorías de crecimiento mediante observación visual de los callos y una escala cualitativa:

A1= Sin crecimiento (no se registró aumento de volumen inicial),

A2= Poco crecimiento (aumenta menos del 50% del volumen inicial) y

A3= Mucho crecimiento (aumenta más del 50% del volumen inicial).

2) Formación de embriones somáticos

Se definieron tres categorías mediante observación del desarrollo morfológico de las estructuras formadas con un estereomicroscopio equipado con una cámara digital. Los explantes se categorizaron según el número de embriones formados mediante la escala:

C1= 1-5 embriones/mm² de área de explante,

C2= 6-10 embriones/mm² de área de explante y

C3= más de 20 embriones/mm² de área de explante.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos, durante la formación de embriones somáticos, se estableció un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental correspondió a un frasco, que contenía cuatro callos con estructuras embriogénicas provenientes de la fase de formación de callos. Cada tratamiento contó con 10 unidades experimentales y cada ensayo se replicó tres veces. Se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2011) y la prueba H de Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$) para comparar las medias de tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos

A los 20 días de cultivo, el 2,4-D promovió en las dos concentraciones, la formación de callos las cuales comenzaron en las zonas de corte de los segmentos cotiledonales empleados como explantes. Se observaron callos de consistencia frágil, pequeños y de coloración amarillenta o blanco amarilla (Figura 1 A). En los tratamientos con ANA la presencia de callos con estructuras embriogénicas fue escasa. Las auxinas, generalmente 2,4-D, se requieren para la formación de callo, aunque su efecto puede potenciarse en combinación con una baja cantidad de citocinina, como BAP, TDZ o kinetina (Rathore *et al.*, 2012). La elección del explante inicial y de los reguladores de crecimiento son dos factores de mayor importancia en la embriogénesis somática (Guan *et al.*, 2016). El tipo y la concentración de auxinas es un factor crítico para la inducción. La aplicación exógena de auxinas induce una respuesta embriogénica, que está asociada con un incremento de la actividad de genes de biosíntesis de AIA (Méndez *et al.*, 2019; Fambrini *et al.*, 2022).

La inclusión de TDZ en el medio de cultivo derivó en la formación de callos con estructuras embriogénicas. Se observaron masas proembriogénicas bien definidas. Los callos formados eran de naturaleza friable, de mayor tamaño que los obtenidos con 2,4-D, sin signos de oxidación (Figura 1 B). El TDZ puede actuar

en la formación de callos de dos formas: con efecto de citocinina, en la diferenciación y multiplicación celular, o con una acción similar a las auxinas, y actuar en la inducción de la competencia embriogénica (Singh *et al.*, 2013). Por otro lado el TDZ puede actuar como un potente elicitor en la producción de etileno endógeno, que puede estimular la multiplicación celular y el incremento en la masa callosa (Feng *et al.*, 2012).

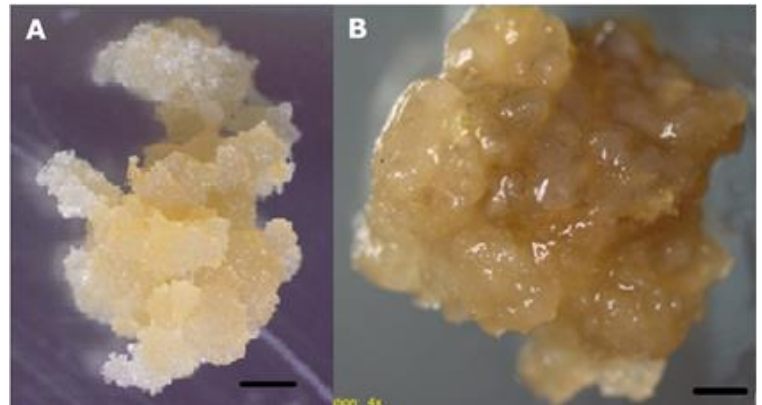


Figura 1. Callos de *Pterogynens nitens* Tul. provenientes de medios de cultivos con: A) 2,4-D (107.41 μ M), callo de color blanco-amarillento (barra= 200 μ m); B) TDZ (27.24 μ M), callo de color amarillo (barra= 1 mm).

La inducción de embriogénesis somática depende del estado de desarrollo de la planta, de su genotipo, del estado de desarrollo del tejido del que se toma el explante, del medio de cultivo en el que se conduce la embriogénesis y del tratamiento inductor que se aplica. En tipa colorada, los segmentos cotiledonares, utilizados como explantes, cultivados en medios de cultivo con regulador de crecimiento como 2,4-D o TDZ, respondieron al tratamiento para la formación de callos con estructuras embriogénicas.

Formación de embriones

Ensayo 1

A la semana de la introducción de las MPEs en los medios de cultivo para la formación de embriones (PES 1 y PES 2), se manifestó un aumento de tamaño tanto en sentido longitudinal como radial, que dio lugar a una continua multiplicación celular. Se observó la aparición de estructuras celulares redondeadas de color blanco opaco y cristalinos, que recubrían totalmente el explante (Figura 2 A).

Los proembriones formados en la fase de formación de callos, en los medios de cultivo con 2,4-D en concentración de 107.41 μ M y ANA (80.56 μ M), inoculados en el medio de cultivo PES 1 a PES 7, presentaron oxidaciones (Figura 2 B). Uno de los problemas más importantes en el cultivo de tejidos de especies forestales es la fenolización por ser la principal causa de oxidación (Gómez, 2007). Se presenta una alta frecuencia de fenolización, como respuesta del explante a la herida, por liberación de polifenoles al medio de cultivo lo cual afecta la regeneración y supervivencia de los explantes. Las especies reactivas de oxígeno,

tales como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^-) y radical peroxilo (RO_2^-), pueden reaccionar fácilmente con la mayoría de las biomoléculas y producir el oscurecimiento y necrosis de los tejidos vegetales, lo que genera un estado de estrés oxidativo que afecta la regulación de la función celular e inhibe el crecimiento o provoca muerte celular del tejido vegetal (Dan, 2008).

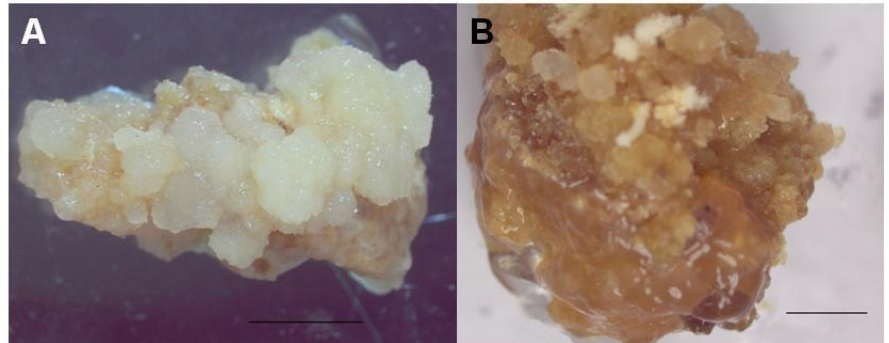


Figura 2. Callos con estructuras embriogénicas en *Pterogyness nitens* Tul., en medio de cultivo PES 1 (2.32 μ M kin). A) Tratamiento de formación de callos con 2,4-D, 180.99 μ M (barra= 1 mm). B) Oxidación de los explantes provenientes del tratamiento de formación de callos con 2,4-D, 107.41 μ M (barra= 0.5 mm).

En las masas proembriogénicas proveniente de la formación de callos con 2,4-D a 180.99 μ M, incubada en el medio de cultivo PES 2 (2.22 μ M BAP), se observó el proceso de histodiferenciación (Merkle *et al.*, 1995; Fambrini *et al.*, 2022). Se distinguieron embriones en el estadio globular a torpedo (Figura 3 A). En secciones transversales, se registró que la elongación de la protodermis permitió pasar de la simetría radial propia del embrión globular a la simetría bilateral (Figura 3 B), y se evidenció un correcto desarrollo de los embriones somáticos (Kaur *et al.*, 2018).

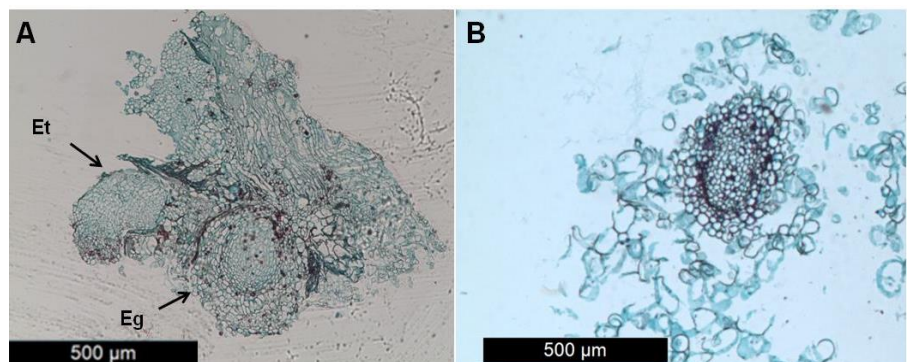


Figura 3. Secciones histológicas de callos con estructuras embriogénicas en *Pterogyness nitens* Tul., en medio de cultivo PES 2 (2.22 μ M BAP). A) Embriones en estadios globular (Eg) y torpedo (Et) proveniente de la formación de callos con 2,4-D a 180.99 μ M. B) Detalle de una estructura embrionaria alargándose, totalmente desprendida del callo.

Los callos con estructuras embriogénicas obtenidas con TDZ e incubados en PES 3 (4.40 μM BAP), generaron estructuras donde se observaron embriones en distintas etapas ontogénicas: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar (Figura 4 A), similares a las etapas de la embriogénesis cigótica (Dodeman *et al.*, 1997). Se observó el estadio de corazón (Figura 4 A), donde los cotiledones aparecen como un grupo de pequeñas células isodiamétricas en la periferia de la región terminal del embrión y continúan el proceso hasta la presencia de embriones en estado torpedo, donde el embrión se alarga y comienza la formación del meristemo apical y radical. El transporte polar de auxinas, comienza en estadios tempranos del estado globular y contribuye a la diferenciación de elementos de conducción (Fambrini *et al.*, 2022) (Figura 4 B).

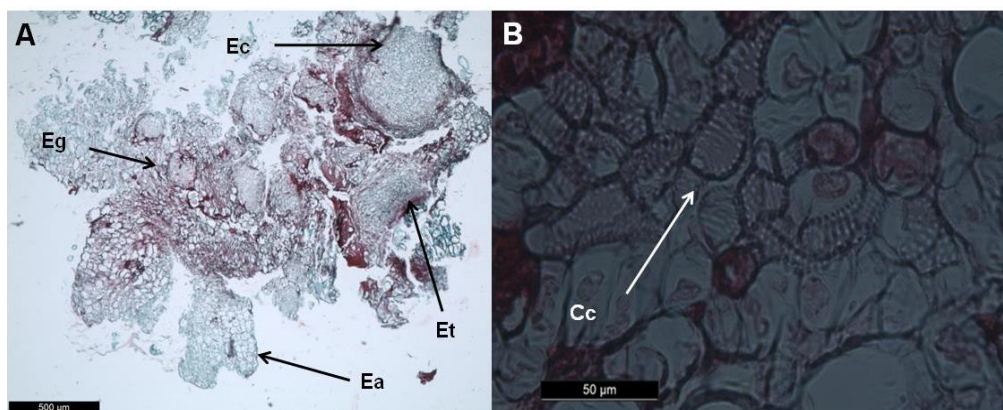


Figura 4. Histodiferenciación en callos con estructuras embriogénicas en *Pterogynnes nitens* Tul., en medio de cultivo PES 3 (4.40 μM BAP), de callos formados con 27.24 μM de TDZ. A) Embriones en estadios: globular (Eg), torpedo (Et), acorazonado (Ea) y cotiledonar (Ec). B) Diferenciación de células conductoras (Cc) próximas a células meristemáticas.

La observación de todas las etapas demostró la asincronía del proceso embriogénico, lo cual se ha registrado en otras especies como *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Guerra *et al.*, 2016).

En los explantes en medio de cultivo con ANA se formaron callos compactos, sin estructuras embriogénicas, con intensa oxidación, la que continuó en el medio de cultivo de formación de embriones, y condujo a su muerte. Los resultados mostraron que el tipo de regulador de crecimiento utilizado en la formación de callos, TDZ o 2,4-D, induce a que células somáticas sean competentes para llevar a cabo la formación de los embriones somáticos (Fambrini *et al.*, 2022).

Ensayo 2

El tipo de regulador de crecimiento utilizado durante la formación de callos influyó sobre el aumento de la masa celular de los explantes incubados en el medio de cultivo de formación de embriones con BAP en distintas concentraciones (PES 3 a PES 6). Se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($H=28.68$ $p<0.0211$).

Las MPEs que provenían de la formación de callos con TDZ, transferidos a cualquiera de los tratamientos con BAP (PES 3 a PES 6), respondieron con un mayor aumento de la masa celular. PES 3 fue el tratamiento que proporcionó el mayor rango de categoría de crecimiento y se ubicó entre las categorías A2 (Poco crecimiento, aumenta menos del 50% del volumen inicial) y A3 (Mucho crecimiento, aumenta más del 50% del volumen inicial) (Figura 5 A), con un incremento de 40% el volumen celular inicial.

Una respuesta similar con TDZ, se registró en la variable categoría número de embriones. PES 3 y PES 4 fueron los tratamientos que permitieron obtener un mayor número de embriones (5 a 10 embriones/mm²), con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos ($H=32.57$ $p<0.0111$) (Figura 5 B). Durante la fase de formación de embriones, de la ES de varias especies, se han utilizado diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento. Por ejemplo, en narciso (*Narcissus jonquilla* L.), Anbari *et al.* (2007), obtuvieron mayor número de embriones somáticos globulares al utilizar el medio de cultivo de MS con 2,4-D (7.23 μ M), BAP (7.04 μ M) y ácido giberélico (AG₃) (1.44 μ M). Igualmente, en *Agave tequilana* Weber cultivar azul, se estimuló la formación de embriones somáticos al aumentar la concentración de BAP de 44 a 66 μ M (Portillo *et al.*, 2007).

Durante la fase de formación de embriones, los callos formados con 2,4-D a 180.99 μ M no presentaron diferencias entre tratamientos para las variables categoría de crecimiento y categoría número de embriones.

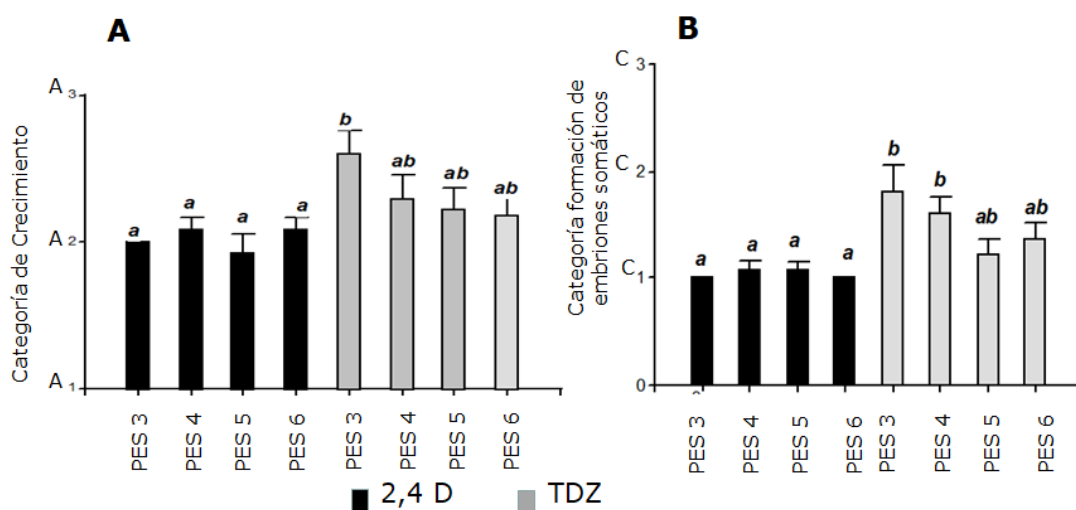


Figura 5. Efecto de medios de cultivo sobre el crecimiento de callos con estructuras embriogénicas y la formación de embriones somáticos de *Pterogynens nitens* Tul. A. Crecimiento de las masas proembriogénicas (A1, A2, A3) y B. Formación de embriones (C1, C2, C3), provenientes de explantes inducidos a la formación de callos con 2,4-D a 180.99 μ M y TDZ e incubados en medios de cultivo con BAP en concentraciones de 4.40 μ M hasta 39.60 μ M (PES 3 a PES 6). A1= Sin crecimiento (no se registró aumento de volumen inicial), A2= Poco crecimiento (aumenta menos del 50% del volumen inicial), A3= Mucho crecimiento (aumenta más del 50% del volumen inicial); C1= 1-5 embriones/mm²

de área de explante; C2= 6-10 embriones/mm² de área de explante y C3= más de 20 embriones/mm² de área de explante. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$).

En el presente trabajo, a los 45 días, las MPEs formadas con TDZ a 27.24 μM , cultivadas en los medios de cultivo PES 3 y PES 4 (4.40 μM y 13.20 μM de BAP), generaron embriones bien definidos (Figura 6 A). Generalmente, la formación de los embriones somáticos ocurre en varias etapas durante la fase de inducción, que varían dependiendo de las especies y de condiciones fisiológicas todavía desconocidas (Corredoira *et al.*, 2019). Después de obtener el callo con estructuras embriogénicas se requiere la multiplicación de las estructuras y lograr el desarrollo de los embriones (Guerra *et al.*, 2016).

En el medio de cultivo PES 4, se registró una germinación precoz de embriones somáticos, y se evidenció el desarrollo del vástago (Figura 6 B).

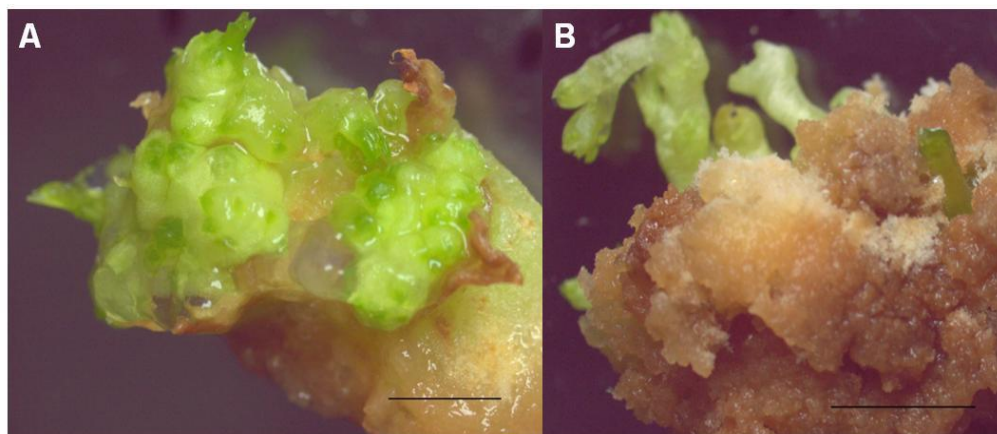


Figura 6. Embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul., proveniente de la formación de callos con TDZ a 27.24 μM , A) Embriones somáticos en medio de cultivo PES 3 (4.40 μM BAP), barra= 0.25 mm. B) Embriones somáticos en medio de cultivo PES 4 (13.20 μM BAP), barra= 0.5 mm.

En el medio de cultivo PES 7 (sin reguladores de crecimiento), a diferencia de lo registrado en otras especies, no se observó crecimiento de las MPEs. Por ejemplo, en el género *Persea*, se diferenciaron embriones somáticos después de tres semanas en medio de cultivo basal MS, sin reguladores de crecimiento y solidificado con agar (5 g l⁻¹) (Vidales *et al.*, 2003). En *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. (Godbole *et al.*, 2002), los embriones se multiplicaron con éxito en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y crecieron hasta obtener plántulas normales. En *Drimiopsis kirkii* Baker, una concentración alta de 2,4-D (5.33 μM) en el medio de cultivo redujo la embriogénesis somática y aumentó la formación de callos, pero al transferirlo a un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, solo se registró la formación de raíces (Lan *et al.*, 2009).

Durante el cultivo de embriones somáticos en medio de cultivo PES 3 (4.40 μM BAP), se observaron anomalías tales como embriones fusionados, con un número

anormal de cotiledones o cotiledones soldados. Los embriones somáticos con anomalías morfológicas no superaron el 20%. Estas alteraciones han sido informadas en otras especies; por ejemplo, en *Azadirachta indica* A. Juss. También se observaron anomalías morfológicas, tales como pluricotiledones, fusión o ausencia de cotiledones (Chaturvedi *et al.*, 2004). Según Ettienne *et al.* (1993) estas anomalías se relacionan con la presencia de auxinas en el medio de cultivo o con desequilibrios en los niveles internos de ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (AIA).

Por otra parte, en el medio de cultivo PES 4 (13.20 μM BAP), las MPEs provenientes del tratamiento con 2,4-D en concentraciones de 180.99 μM y los provenientes de TDZ, presentaron embriogénesis secundaria (Figura 7). La embriogénesis secundaria, está asociada a un aumento en el nivel de auxinas exógenas, en un determinado momento de la histodiferenciación, que no permite avanzar más allá de la etapa globular (Parrot, 2002). La formación de embriones secundarios, puede darse a partir del eje principal del embrión o en la zona del suspensor (Gavish *et al.*, 1992) y puede contrarrestarse al disminuir los niveles de auxinas en los medios de cultivo o suprimirlos completamente, ya que estos estimulan la división de células embriogénicas que permanecen en estado de latencia en las paredes del eje principal o de las células del suspensor (Nomura y Komamine, 1995). Las auxinas como el 2,4-D, constituyen el factor más asociado a la multiplicación continua de las células embriogénicas. Una vez que se han obtenidos células embriogénicas, la presencia continua de este regulador de crecimiento inhibe el desarrollo normal y la maduración del embrión somático y si el nivel de auxinas es muy alto se inicia un nuevo ciclo de producción de embriones somáticos; si los niveles disminuyen o se eliminan se produce el crecimiento y eventual maduración de los embriones somáticos (Parrot, 2002). El TDZ exhibe efectos tanto de auxina como de citocinina, lo que explica su amplia versatilidad en aplicaciones *in vitro* e *in vivo* (Dinani *et al.*, 2018).

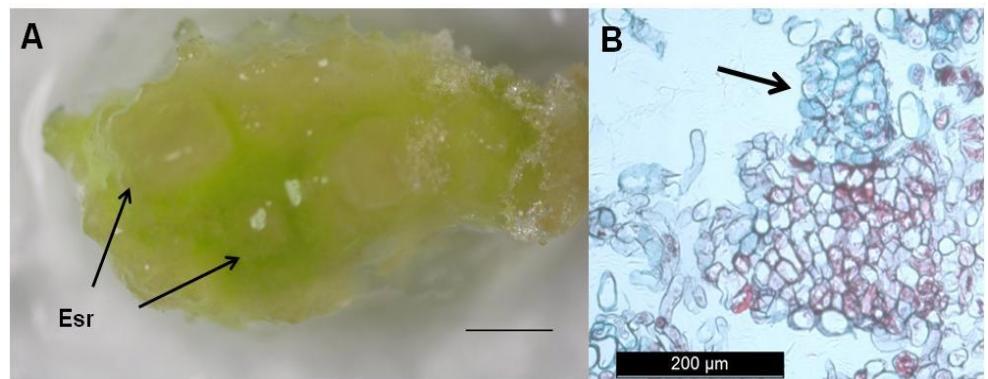


Figura 7. Embriogénesis secundaria (Esr) en embrión somático de *Pterogyne nitens* Tul. A) Embrión proveniente de callos formados con TDZ, y colocado en medio de cultivo PES 4 (13.20 μM BAP), barra= 1 mm. B) Embriogénesis secundaria en embrión somático, proveniente de callos formados con 2,4-D a 180.99 μM y colocado en medio de cultivo PES 4, la flecha indica el nuevo embrión, iniciando su formación.

Se observó que las MPEs, obtenidas con TDZ y cultivadas en un medio de cultivo con BAP en concentraciones de 4.40 y 13.20 μM , causaron mayor impacto en la respuesta embriogénica.

El TDZ estimuló la embriogénesis somática repetitiva, al igual que en *Azadirachta indica* (Artigas y Fernández da Silva, 2015), donde el empleo de este regulador aumentó el número de embriones secundarios por embrión primario. Se ha informado que el TDZ podría sustituir a las auxinas y citocininas requeridas para la formación de embriones somáticos (Daigny *et al.*, 1996). Los embriones nuevos crecen fusionados sobre los embriones originales y estos a su vez generan más embriones lo que conduce en el proceso a un ciclo repetitivo, se forman masas embriogénicas que no diferencian a embriones y se limita su individualización y desarrollo independiente. Los reguladores de crecimiento son determinantes en la respuesta embriogénica ya que estos interactúan con los niveles hormonales endógenos y en algunos casos las respuestas están determinadas por la acción conjunta de dos o más reguladores (Fambrini *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

Las condiciones experimentales ensayadas permitieron la formación de embriones somáticos de tipa colorada. Se observaron distintos estadios embrionarios: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar. Para obtener una adecuada respuesta los callos con estructuras embriogénicas formados con TDZ, deben ser transferidos a un medio de cultivo con 4.40 μM o 13.20 μM de BAP. La obtención de embriones somáticos en esta especie forestal tiene gran importancia, no solo económica sino también de preservación de esta especie amenazada.

REFERENCIAS

- Anbari S, Tohidfar M, Hosseini R, Haddad R (2007) Somatic embryogenesis induction in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi. Plant Tissue Culture and Biotechnology 17(1): 37-46
- Artigas MD, Fernández da Silva R (2015) Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Azadirachta indica* A. Juss. Acta Biológica Colombiana 20(2): 73-83
- Chaturvedi R, Razdan MK, Bhojwani SS (2004) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Plant Cell Reports 22(11): 801-809
- Corredoira E, Ballester A, Ibarra M, Vieitez AM (2015) Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. Tree physiology 35(6): 678-690
- Corredoira E, Merkle SA, Martínez MT, Toribio M, Canhoto JM, Correia SI, Ballester A, Vieitez AM (2019) Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. Critical Reviews in Plant Sciences 38(1): 29-97; doi: 10.1080/07352689.2018.1551122

Corredoira E, San José MC, Vieitez AM (2012) Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* tree. *Trees* 26(3): 881-891

Daigny G, Paul H, Sangwan RS, Sangwan Norreel BS (1996) Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh. (cv 'Gloster 69'). *Plant Cell Reports* 16(3-4): 153-157

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW (2011) Infostat versión 2010. Grupo Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dinani ET, Shukla MR, Turi CE, Sullivan JA, Saxena P K (2018) Thidiazuron: modulator of morphogenesis *in vitro*. En: Ahmad N, Faisal M (Eds). *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*, pp.1-36. Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-8004-3_1

Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48(8): 1493-1509

Ettienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E, Carron MP (1993) Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). *Plant Science* 88: 91-96

Fambrini M, Usai G, Pugliesi C (2022) Induction of Somatic Embryogenesis in Plants: Different Players and Focus on WUSCHEL and WUS-RELATED HOMEODOMAIN (WOX) Transcription Factors. *Int J Mol Sci* 2022 (23): 15950; doi: 10.3390/ijms232415950

Feng BH, Wu B, Zhang CR, Huang X, Chen YF, Huang XL (2012) Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNA induced by thidiazuron during somatic embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Plant Physiology* 169(2): 176-182

Gavish H, Vardi A, Fluhr R (1992) Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta* 186(4): 511-517

Godbole S, Sood A, Thakur R, Sharma M, Ahuja PS (2002) Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Current Science-Bangalore* 83(7): 885-888

Gómez PJM (2007) Efecto de tratamientos antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia, Honduras. Tesis para el Grado Académico de Licenciatura, Zamorano Escuela Agrícola Panamericana, Honduras

Guan Y, Li SG, Fan XF, ZH Su (2016) Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 938; doi: 10.3389/fpls.2016.00938

Guerra MP, Steiner N, Farias Soares FL, Vieira L do N, Fraga HPF, Rogge Renner GD, Maldonado SB (2016) Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (*Araucariaceae*). En: MA Germana, Lambardi M (Eds). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, pp. 439-450. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6_24

IUCN (2015) The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2015.1. En: <http://www.iucnredlist.org> Consultado 10/04/23

Kaur A, Reddy MS, Kumar A (2018) Direct somatic embryogenesis of *Solanum tuberosum* (L.) cultivar 'Kufri Chipsona 2'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 134(3): 457-466

Lan TH, Hong PI, Huang CC, Chang WC, Lin CS (2009) High-frequency direct somatic embryogenesis from leaf tissues of *Drimys piperita* Baker (giant squill). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 45(1): 44-47

Méndez HA, Ledezma M, Avilez RN, Juárez YL, Skeete A, Avilez J, De la Peña C, Loyola VM (2019) Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 10: 77; doi: 10.3389/fpls.2019.00077

Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe AT (Ed). *In vitro embryogenesis in plants*, pp. 155-203. Springer, Dordrecht

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* 15: 473-497

Nomura K, Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe AT (Ed). *In vitro embryogenesis in plants*, pp. 249-265. Springer, Dordrecht

Parrott W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara

Pijut PM, Lawson SS, Michler CH (2011) Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47(1): 123-147

Portillo L, Santacruz Ruvalcaba F, Gutiérrez Mora A, Rodríguez Garay B (2007) Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 43: 569-575; doi: 10.1007/s11627-007-9046-5

Quiroz FR, Rojas R, Galaz RM, Loyola VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 285-301

Rathore JS, Rai MK, Shekhawat NS (2012) Induction of somatic embryogenesis in gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18(4): 387-392

Singh CK, Sandeep R, Patil VR, Jaiswal PS, Subhash N (2013) Plant regeneration from leaf explants of mature sandalwood (*Santalum album* L.) trees under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* volume 49: 216–222

Vacca M, Bonomo C, Avilés Z, Díaz L (2014) Embriogenic calli induction and somatic proembryo formation in *Pterogyne nitens* Tul. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16(2): 194-203

Vidales Fernández I, Salgado Garciglia R, Gómez Lim MA, Angel Palomares E, Guillén Andrade H (2003) Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass). V Congreso Mundial del Aguacate, Libro de resúmenes pp. 89-95, 19-24 de octubre de 2003, Granada-Málaga, España

von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filanova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todas las personas que hicieron posible este trabajo.

Financiamiento: Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSA). Proyecto A Nº 2519.

Conflicto de interés: Los autores no declaran conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización MVM, Curación de datos MVM, EN, ZA, RHM, ABP, Análisis formal MVM, EN, ZA, Adquisición de fondos MVM, Investigación MVM, EN, ZA, RHM, ABP, Metodología MVM, EN, ZA, Administración del proyecto MVM, Recursos MVM, Supervisión MVM, Validación MVM, EN, ZA, Visualización MVM, Redacción - borrador original MVM, Redacción - revisión y edición MVM.

Disponibilidad de datos: Los datos del estudio se presentan en el artículo. Para otras consultas dirigirse al autor para correspondencia.

Maritza Vacca Molina, <https://orcid.org/0000-0002-6229-5778>

Elvia Nieves, <https://orcid.org/0000-0002-4363-3153>

Zulma Avilés, <https://orcid.org/0000-0002-0981-8162>

Roberto H. Martínez, <https://orcid.org/0000-0003-2786-3378>

Anabel Barbosa Pons, <https://orcid.org/0009-0006-7926-0690>

Cómo citar:

Vacca Molina M, Nieves E, Avilés Z, Martínez RH, Barbosa Pons A (2024) Formación de embriones somáticos de *Pterogyne nitens* Tul.. *Biotecnología Vegetal* 24: 240615