

Efecto del CO₂ en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' y *Clematis tangutica* K.

Raúl Barbon¹, Walter Preil², Alina Capote¹, Elio Jiménez¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: raulb@ibp.co.cu

²Private address. Birkenhöhe 28. Ammersbek. Germany. 22949.

RESUMEN

El ambiente *in vitro* es un factor que en los últimos años se ha comenzado a investigar, debido a que los gases como el oxígeno, dióxido de carbono y el etileno juegan un papel importante en la morfogénesis de los embriones somáticos y su desarrollo en plantas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del CO₂ en la germinación de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo') y clematis (*Clematis tangutica* K.). Se emplearon tres mezclas de gases compuesta por concentraciones de CO₂ (2.5, 5.0 y 10.0%) combinada con 21% O₂ y dos controles (intercambio pasivo y ventilación forzada). Se obtuvo un efecto positivo del CO₂ sobre la germinación de los embriones somáticos en etapa de torpedo en café y clematis, porque en los tratamientos con intercambio pasivo, donde hubo acumulación de CO₂, la germinación de los embriones somáticos fue superior a los tratamientos con ventilación forzada. Con 2.5% y 5.0% de CO₂ se estimula el proceso de germinación, mientras que con 10.0% de CO₂ se produce una inhibición de la germinación con la aparición de malformaciones e hiperhidricidad.

Palabras clave: atmósfera gaseosa, dióxido de carbono, embriogénesis somática, embriogénesis secundaria, hiperhidricidad

Influence of the *in vitro* environment on the germination of somatic embryos of *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' and *Clematis tangutica* K.

ABSTRACT

The *in vitro* environment is a factor that in recent years has begun to investigate, because gases such as oxygen, carbon dioxide and ethylene play an important role in the morphogenesis of somatic embryos and their development in plants. The objective of this work was to determine the effect of the CO₂ on the germination of coffee somatic embryos (*Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo') and clematis (*Clematis tangutica* K.). Three gas mixtures composed of CO₂ concentrations (2.5, 5.0 and 10.0%) combined with 21% O₂ and two controls (passive exchange and forced ventilation) were used. A positive effect of CO₂ on the germination of somatic embryos in the torpedo stage in coffee and clematis was obtained, because in the treatments with passive exchange, where there was CO₂ accumulation, germination of the somatic embryos was superior to the treatments with Forced ventilation. With 2.5% and 5.0% CO₂, the germination process is stimulated while with 10.0% CO₂ there is an inhibition of germination with the appearance of malformations and hyperhydricity.

Keywords: gaseous atmosphere, carbon dioxide, somatic embryogenesis, secondary embryogenesis, hyperhydricity

INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas, dado por la naturaleza misma del proceso embriogénico. Este consiste en la formación de un embrión viable a partir de células aisladas con lo cual

se logran altos coeficientes de multiplicación y permite manejar grandes cantidades de propágulos en volúmenes reducidos de medio de cultivo (Etienne *et al.*, 2016).

El ambiente gaseoso en los frascos de cultivo en los diferentes sistemas de micropropagación se caracterizan por una humedad relativa alta y variaciones en la concentración de O₂, CO₂, acumulación de

etileno y otras sustancias tóxicas (Zavattieri *et al.*, 2010; Kaur, 2015). El ambiente *in vitro* es un factor que en los últimos años se ha comenzado a investigar, dado que los componentes como el CO₂ y el etileno juegan un papel importante en la morfogénesis de los embriones somáticos (Meskaoui *et al.*, 2006; Vilchez *et al.*, 2016).

Algunas investigaciones se han realizado sobre el efecto de diferentes componentes del ambiente *in vitro* como son oxígeno y dióxido de carbono en el desarrollo morfogénico de los embriones somáticos (Hohe *et al.*, 1999; de Fera *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Barbón *et al.*, 2008) y otros gases como el etileno (Meskaoui *et al.*, 2006). Sin embargo, una fase crucial dentro de la embriogénesis somática es la de germinación, donde un embrión somático en etapa avanzada de desarrollo convierte en una planta. Aún es poco conocida la influencia del ambiente *in vitro*, en específico de la concentración de CO₂, sobre la germinación de los embriones somáticos y su desarrollo en plantas. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del CO₂ en la germinación de embriones somáticos de dos especies de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Esta investigación se realizó con embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' y *Clematis tangutica* K. en etapa de torpedo. Los embriones somáticos fueron obtenidos a partir de la metodología propuesta por Barbón *et al.* (2003).

Influencia de la concentración de CO₂ del ambiente *in vitro* sobre la germinación de embriones somáticos

Para evaluar la influencia de la concentración de CO₂ en el ambiente *in vitro* sobre la germinación de los embriones somáticos, se emplearon tres mezclas de gases con CO₂ (2.5, 5.0 y 10.0%) combinadas con 21% de oxígeno y dos controles (intercambio pasivo y ventilación forzada). Los frascos de cultivo fueron modificados para mantener las concentraciones de dióxido de carbono y oxígeno constantes en el tiempo (Figura 1).

A partir de una suspensión celular embriogénica con 56 días de cultivo en fase de formación y diferenciación de embriones somáticos fueron seleccionados embriones somáticos en etapa de torpedo. De cada especie en estudio, se colocaron 15 embriones somáticos por frasco de cultivo. Se empleó un total de seis frascos por cultivo por tratamiento y el experimento fue repetido dos veces (n=180 por tratamiento). Los medios de cultivo utilizados fueron los empleados para germinación de embriones somáticos. Para *Clematis* se utilizó un medio de cultivo en estado semisólido compuesto por las sales Gamborg *et al.* (1968), 0.1 mg l⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), 0.2 mg l⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y 1% de sacarosa. Para café se empleó un medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962), 0.23 mg l⁻¹ 6-BAP y 1% de sacarosa. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7 con NaOH (0.5 N) y HCl (0.5 N) antes de la esterilización en autoclave, a 121°C y 1.2 kg cm⁻², durante 20 minutos.

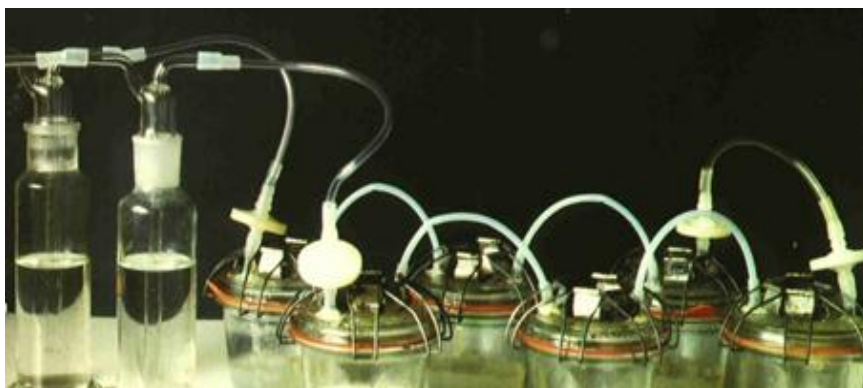


Figura 1. Frascos de cultivo modificados utilizados para los tratamientos de mezcla de gases aplicados a los embriones somáticos de café y clematis.

En esta experiencia se evaluaron las siguientes variables cada 15 días durante los 60 días de cultivo:

- ✓ Número de embriones somático germinados por frasco de cultivo.
- ✓ Número de embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria asociada.
- ✓ Número de embriones somáticos viables por frasco, se consideró aquellos embriones somáticos germinados y los que no germinaron pero tenían vitalidad celular, la cual fue determinada mediante el método de tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA) (Widholm, 1972).
- ✓ Embriones somáticos con malformaciones, se refiere la cuantificación de los embriones somáticos que no poseen el aspecto morfológico típico durante la transición de la etapa torpedo a embrión germinado.
- ✓ Embriones somáticos con hiperhidricidad.

Análisis estadísticos

Los datos experimentales se procesaron estadísticamente mediante un análisis de homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett y las medias fueron comparadas empleando la prueba de rangos múltiples de Bonferroni. Para la variable número de embriones malformados se modificaron los datos mediante la transformación $\arcsen x^{1/2}$. El programa estadístico empleado fue SAS GLM (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En café el mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos se obtuvo en los tratamientos con 2.5 y 5.0% de CO₂, con respecto a los otros tratamientos (Tabla 1). Debe destacarse que estos mostraban a los 15 días de cultivo un 12.0% (10.83 ES) y 9.0% (10.16 ES) de los embriones somáticos con un desarrollo de las hojas cotiledonales y del hipocótilo. En el tratamiento con intercambio pasivo los resultados fueron superiores al tratamiento con ventilación forzada.

En todos los tratamientos el número de embriones viables fueron altos, excepto en el tratamiento con 10.0% de CO₂ (Tabla 2). Durante la fase de germinación, los embriones somáticos presentaron embriones somáticos secundarios asociados. El mayor porcentaje se obtuvo en la variante con 5.0% de CO₂ en la mezcla gaseosa mientras que con ventilación forzada la embriogénesis somática secundaria se observó en forma de grupos, al parecer debido a la multiplicación repetitiva de los proembriones formados asociados al embrión somático en desarrollo. La embriogénesis secundaria es una de las causas de la asincronía durante la embriogénesis somática, embriones somáticos de *novus* pueden formarse a partir del eje principal del embrión somático o en la zona donde previamente se encontraba el suspensor durante las etapas iniciales de histodiferenciación (Gavich *et al.*, 1992) y esto pudiera ser debido a que existe

Tabla 1. Influencia de diferentes condiciones de ambiente *in vitro* sobre la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en la etapa de torpedo después de 60 días de cultivo.

Tratamientos	No. ES germinados/frasco
V. Forzada	8.50 c
I. pasivo	9.16 b
2.5% CO ₂	10.83 a
5.0% CO ₂	10.16 a
10.0% CO ₂	7.0 d
± E.E.	± 0.43
C.V.	4.70%

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según la comparación basada en la prueba de Bonferroni ($n=180$)

una inducción de la división de las células embriogénicas que podrían haber quedado latentes en la protodermis del embrión o del suspensor (Vondráková *et al.*, 2015).

El desarrollo de malformaciones en los embriones somáticos se manifestó principalmente en el tratamiento con 10.0% de CO₂ en la mezcla gaseosa (Tabla 3). Estos embriones somáticos presentaban un crecimiento anormal, formación de callo en la superficie del embrión y en algunos casos se observaron algunas afectaciones morfológicas como son la deformación de las primeras hojas cotiledonales o fusión de estas. Muy relacionada con las malformaciones estuvo la hiperhidricidad de los embriones somáticos bajo el efecto de la ventilación forzada, donde

el 30.6% (4.6 ES) presentaban síntomas de hiperhidricidad (Figura 2 A). Sin embargo, esto no fue observado en las variantes donde se empleó CO₂.

En los diferentes tratamientos con CO₂ y control, las primeras señales de la germinación de los embriones somáticos lo constituyen la elongación del hipocótilo, desarrollo del color verde de los cotiledones y la elongación de la radícula. Estas son características propias de embriones somáticos maduros (Von Aderkas *et al.*, 2015). Sólo los embriones somáticos con una morfología normal que hayan acumulado suficientes materiales de almacenamiento al final de la maduración se desarrollan en plantas (von Arnold y Clapham, 2008).

Tabla 2. Número de embriones viables y embriogénesis secundaria de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en diferentes condiciones de ambiente *in vitro* a los 60 días de cultivo.

Tratamientos	No. ES viables por frasco	No. ES con embriogénesis secundaria por frasco
V. Forzada	11.83 a	1.5 c
I. Pasivo	11.50 a	2.0 b
2.5% CO ₂	12.50 a	2.33 b
5.0% CO ₂	12.33 a	4.5 a
10.0% CO ₂	10.0 b	1.16 c
± E.E.	± 0.40	± 0.13
C.V.	3.44%	5.65%

Medias con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la comparación basada en la prueba de Bonferroni ($n=180$)

Tabla 3. Efecto de la concentración de CO₂ sobre la aparición de malformaciones y hiperhidricidad de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en germinación después de 60 días de cultivo.

Tratamientos	No. ES con malformaciones por frasco	No. ES con hiperhidricidad por frasco
V. Forzada	0.66 b	4.6 a
I. Pasivo	0.33 c	0.33 b
2.5% CO ₂	0 d	0 c
5.0% CO ₂	0 d	0 c
10.0% CO ₂	1.16 a	0 c
± E.E.	± 0.032	± 0.021
C.V.	7.64%	2.14%

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según la comparación basada en la prueba de Bonferroni ($n=180$)

Todas las plantas *in vitro* obtenidas a partir de los embriones somáticos germinados bajo el efecto de las diferentes concentraciones de CO₂ alcanzaron un desarrollo normal, incluso con la variante con 10.0% (Figura 2 B).

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que con modificaciones del ambiente físico en los vasos de cultivo se alcance una optimización de la maduración de los embriones somáticos. Ochatt y Revilla (2016) han hecho mayor énfasis en la importancia de tratamientos para la postmaduración de los embriones somáticos, pues en algunas especies cuando estos se han transferido directamente de las condiciones de maduración a germinación, los resultados no han sido favorables.

El mayor número de embriones somáticos germinados de *Clematis tangutica* se obtuvo con la variante con 5.0% de CO₂ en la mezcla gaseosa (Tabla 4). En el control con intercambio pasivo hubo una mayor estimulación de la germinación con respecto a la variante con ventilación forzada. Kvaalen y von Arnold (1991) describen la germinación y maduración de embriones somáticos de *Picea abies* (L.) Karst a bajas concentraciones de oxígeno (5.0% O₂) y altas de dióxido de carbono (6.0% CO₂). Sin embargo, no todas las especies responden positivamente a concentraciones superiores de 5.0% de CO₂. Estudios realizados por Bewley *et al.* (2013) encontraron que concentraciones de CO₂ superiores a 4.0% CO₂ pueden impedir la germinación de algunas especies como *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic.

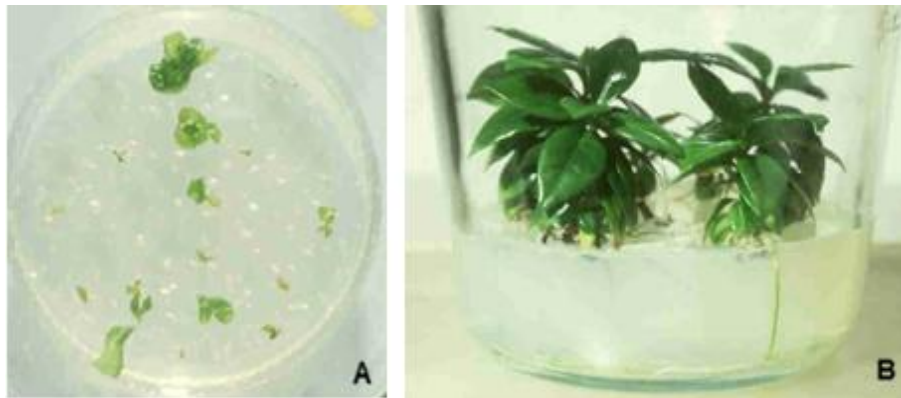


Figura 2. (A) Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en fase de germinación con hiperhidricidad en un ambiente *in vitro* con ventilación forzada. (B) Plantas *in vitro* obtenidas en el tratamiento con 5.0% CO₂ en la mezcla gaseosa.

Tabla 4. Efecto del CO₂ sobre la germinación de embriones somáticos de *Clematis tangutica* K. en la etapa de torpedo después de 60 días de cultivo.

Tratamientos	No. ES germinados por frasco
V. forzada	8.83 c
I. pasivo	10.16 b
2.5% CO ₂	10.83 b
5.0% CO ₂	12.66 a
10.0% CO ₂	7.83 d
± E.E.	± 0.48
C.V.	4.77%

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según la comparación basada en la prueba de Bonferroni ($n=180$)

Los valores de número de embriones viables, al igual que en cafeto, fueron altos (Tabla 5) y se apreció la formación de embriones somáticos secundarios. El mayor porcentaje de embriogénesis secundaria se observó en los tratamientos con 2.5% y 5.0% de CO₂ con 21.06% (3.16 ES) y 28.86% (4.33 ES), respectivamente.

En el tratamiento con 10.0% de CO₂ en la mezcla gaseosa el 16.66% de los embriones poseían malformaciones (Tabla 6), mientras que entre los otros tratamientos no se presentaron diferencias significativas. En estos se observó un bajo porcentaje de malformaciones de los embriones en germinación (Figura 3 A). Sin embargo, en el tratamiento con ventilación forzada el 6.66% (1.0 ES) de los embriones somáticos presentaron malformaciones y además hubo un 18.86% (2.83 ES) de embriones somáticos con hiperhidricidad (Figura 3 B). Resultados

similares fueron obtenidos en cafeto en este mismo tratamiento.

Los embriones somáticos en etapa de torpedo que lograron la germinación completa bajo las diferentes concentraciones gaseosas alcanzaron un desarrollo normal, sin observarse variaciones morfológicas (Figura 3 C).

De acuerdo con los resultados, el CO₂ influyó en la maduración y germinación de los embriones somáticos. Esto se puede evidenciar al comparar el control con intercambio pasivo, en el cual hay acumulación de CO₂, con respecto al control con ventilación forzada. Según Maximova *et al.* (2014) una consecuencia de la insuficiente maduración de los embriones somáticos, el desarrollo de embriones malformados y la formación de hojas cotiledonales muy carnosas o con peciolo enroscado, se debe a la poca atención y control del ambiente gaseoso *in vitro*.

Tabla 5. Efecto de la concentración de CO₂ sobre la viabilidad y el desarrollo de embriogénesis secundaria de los embriones somáticos de *Clematis tangutica* K.

Tratamientos	No. ES viables por frasco	No. ES con embriogénesis secundaria por frasco
V. Forzada	12.16 bc	1.16 cd
I. Pasivo	13.0 ab	1.33 c
2.5% CO ₂	13.33 ab	3.16 b
5.0% CO ₂	13.83 a	4.33 a
10.0% CO ₂	11.50 c	1.0 d
± E.E.	± 0.45	± 0.11
C.V.	3.53%	6.33%

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según la comparación basada en la prueba de Bonferroni ($n=180$)

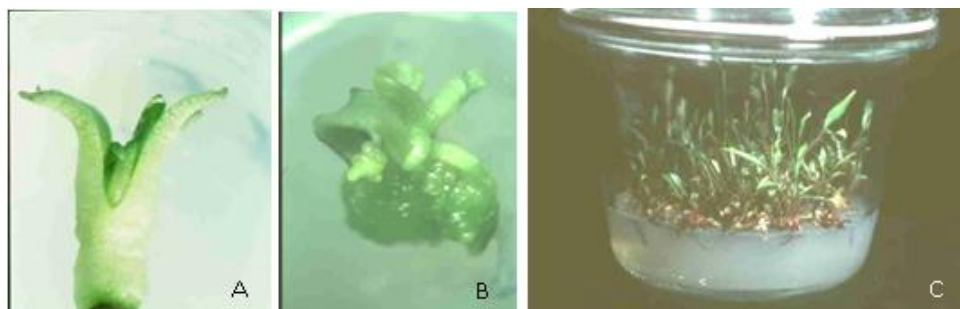


Figura 3. (A) Embrión somático de *Clematis tangutica* K. en etapa cotiledonal obtenido en el tratamiento con 5.0% de CO₂ y (B) Embrión malformado y con hiperhidricidad obtenido bajo ventilación forzada. (C) Plantas *in vitro* de clematis obtenidas a partir de embriones germinados a 5.0% de CO₂ en la mezcla gaseosa.

Es posible que altas concentraciones de CO₂ (10.0%) promovieran un incremento de los niveles endógenos de etileno, lo cual estimuló las oxidasas del ácido indolacético (AIA) y provocó que los niveles de esta hormona disminuyeran, mientras que los niveles de citoquininas se mantuvieron altos. Estos cambios conducen a un desbalance hormonal que trae como consecuencia una incorrecta diferenciación celular y por lo tanto la malformación y la hiperhidratación de los embriones somáticos (Nowak *et al.*, 2015).

Es conocido el etileno produce una rápida y completa inhibición del movimiento lateral del ácido indolacético endógeno (Rêgo *et al.*, 2012). Este podría causar reacondicionamientos en las concentraciones inducidas de AIA en el tejido lo cual conduce a un decremento de AIA en los sitios de regeneración y cambios en los niveles citoquininas-auxina que son desfavorables para la regeneración (Khan *et al.*, 2015).

Al realizarse un análisis de los resultados sobre la influencia del CO₂ en la germinación de embriones somáticos de café y *Clematis* se puede plantear que el CO₂; componente del ambiente *in vitro*, tiene un efecto sobre la germinación de los embriones somáticos. Un control del ambiente *in vitro* podría contribuir no solo mejorar la eficiencia de la embriogénesis somática sino también a mejorar la calidad de planta *in vitro* para una mejor supervivencia *ex vitro*. Se ha determinado que componentes de la atmósfera gaseosa como el CO₂ tienen efecto no solo en la formación y de los embriones somáticos (Barbón *et al.*, 2008; Barbón *et al.*, 2016) sino también en los cambios morfogénicos que ocurren durante culminación de la germinación con el desarrollo y crecimiento de la planta.

CONCLUSIONES

El CO₂ en concentraciones de 2.5% y 5.0% en el ambiente *in vitro* de los frascos estimula el proceso de germinación de embriones de café y clematis en etapa de torpedo, sin embargo, 10.0% de CO₂ inhibe la germinación con la aparición de malformaciones e hiperhidricidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Sistema de Intercambio Académico Alemán (DAAD) y al Prof. Dr. Walter Preil que

contribuyeron a la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

Barbón R, Jiménez E, Capote A (2003) Influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta. *Biotecnología Vegetal* 3(3): 131-135

Barbón R, Jiménez E, Preil W (2008) Influence of *in vitro* environment on somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo: the effects of carbon dioxide on embryogenic cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95(2): 155-161; doi: 10.1007/s11240-008-9427-4

Barbón R, Preil W, Capote A, Jiménez E (2016) Efecto del CO₂ sobre el desarrollo de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' y *Clematis tangutica* K. *Biotecnología Vegetal* 16 (3): 153 - 160

Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) Germination. En: Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (eds). *Physiology of development, germination and dormancy*, pp. 133–181. Springer, New York; doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4_4

de Feria M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(1) 1-6; doi: 10.1023/A:1021202305692

Rêgo MM, Rêgo ER, Farias Filho LP (2012) Induced anther callogenesis of *Capsicum annuum* L. *Acta Horti* 929:411–416

Etienne H, Bertrand B, Dechamp E, Maurel P, Georget F, Guyot R, Breidler JC (2016) Are genetics and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. *Human Genetics and Embryology* 6(136): 5; doi: 10.4172/2161-0436.1000136

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Plant cell cultures. 1. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50(1): 151-158; doi: org/10.1016/0014-4827(68)90403-5

Gavich H, Vardi A, Fluhr R (1992) Suppression of somatic embryogenesis in citrus cell cultures by extracellular proteins. *Planta* 186 (4): 511-517; doi: 10.1007/BF00198030

Hohe A, Winkelmann T, Schwenkel HG (1999) CO₂ accumulation in bioreactors suspension cultures of

- Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 18(10): 863-867; doi: 10.1007/s002990050675
- Huang SY, Chan HS, Wang TT (2006) Induction of somatic embryos of celery by control of gaseous compositions and other physical conditions. *Plant Growth Regulation* 49(2): 219–227; doi: 10.1007/s10725-006-9113-7
- Khan N, Ahmed M, Hafiz I, Abbasi N, Ejaz S, Anjum M (2015) Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *OENO One* 49(1): 37-45; doi: 10.20870/oeno-one.2015.49.1.95
- Kaur RP (2015) Photoautotrophic micropropagation an emerging new vista in micropropagation-A review. *Agricultural Reviews* 36(3): 198-207; doi: 10.5958/0976-0741.2015.00023.9
- Kvaalen H, von Arnold S (1991) Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell and Organ Culture* 27(1): 49-57; doi: 10.1007/BF00048206
- Maximova SN, Florez S, Shen X, Niemenak N, Zhang Y, Curtis W, Guiltinan MJ (2014) Genome-wide analysis reveals divergent patterns of gene expression during zygotic and somatic embryo maturation of *Theobroma cacao* L., the chocolate tree. *BMC plant biology* 14(1): 185; doi: 10.1186/1471-2229-14-185
- Meskaoui AE, Desjardins Y, Tremblay FM (2006) The effects of *in vitro* gaseous environment on the maturation of somatic embryo of black spruce (*Picea mariana* [Mill.] BSP) and white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss). *Moroccan Journal of Biology* 1(2-3): 12-20
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052
- Nowak K, Wójcikowska B, Gaj MD (2015) ERF022 impacts the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through the ethylene-related pathway. *Planta* 241(4): 967-985
- Ochatt SJ, Revilla MA (2016) From stress to embryos: some of the problems for induction and maturation of somatic embryos. En: Germana M, Lambardi M (eds). *In Vitro* embryogenesis in higher plants. *Methods in Molecular Biology*, pp. 523-536. Humana Press, New York, NY; doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6_31
- Parrott W, Dryden G, Vogt S, Hildebrand D, Cillins G, Williams E (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant* 24(8): 817; doi: 10.1007/BF02623653
- Rêgo MM, Rêgo ER, Farias Filho LP (2012) Induced anther callogenesis of *Capsicum annuum* L. *Acta Horti* 929:411–416
- Vilchez J, Romero CS, Alfaro FP, Valero NA, Ferrer LM, Padrón AC, de Sierralta SL (2016) Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. en envases de cultivo con ventilación forzada. *Revista de la Facultad de Agronomía* 33(2): 181-192
- Von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier JP, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Lelu-Walter MA (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x Marschlinii*). *Annals of botany* 115(4): 605-615; doi: doi.org/10.1093/aob/mcu254
- von Arnold S, Clapham D (2008) Spruce embryogenesis. En: Suárez, Bozhkov (eds). *Methods in molecular biology* 427, pp. 31-47. Humana Press, Totowa; doi: 10.1007/978-1-59745-273-1_3
- Vondráková Z, Eliášová K, Vágner M, Martincová O, Cvikrová M (2015) Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. *Plant growth regulation* 75(2): 405-414; doi: 10.1007/s10725-014-0001-2
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47(4): 189-194
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1): 1-9; doi: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-4

Recibido: 16-12-2016

Aceptado: 22-02-2017