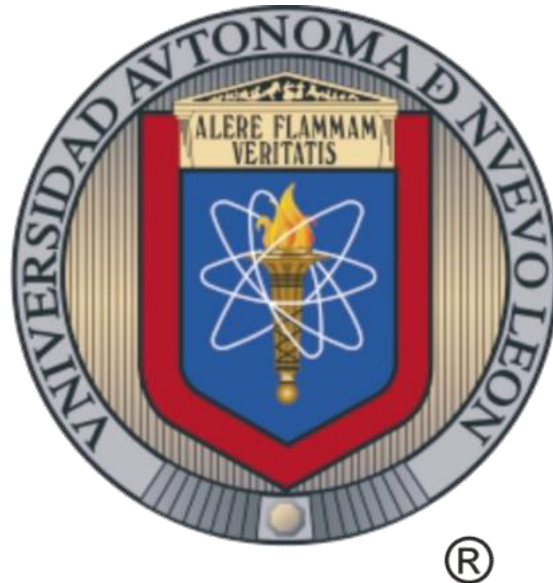


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA E INDUCCIÓN DE CALLO *IN VITRO* EN
ESPECIES FABÁCEAS NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN**

PRESENTA

M.C. ALEJANDRO IBARRA LÓPEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

JULIO, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA E INDUCCIÓN DE CALLO *IN VITRO* EN
ESPECIES FABÁCEAS NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN**

PRESENTA

M.C. ALEJANDRO IBARRA LÓPEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JULIO DE 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA E INDUCCIÓN DE CALLO *IN VITRO* EN
ESPECIES FABÁCEAS NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN**

PRESENTA

M.C. ALEJANDRO IBARRA LÓPEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JULIO DE 2019

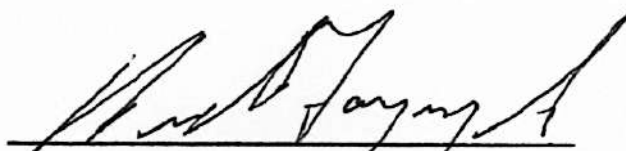
**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

COMITÉ PARTICULAR




Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías
Director de Tesis



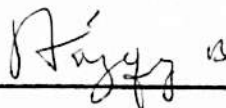
PhD. Héctor Lozoya Saldaña
Codirector Externo



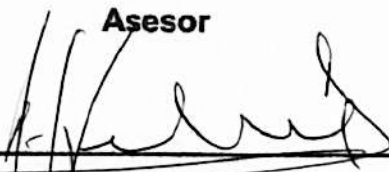
PhD. Emilio Olivares Sáenz
Asesor



Dr. José Elías Treviño Ramírez
Asesor



PhD. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado
Asesor



PhD. Juan Antonio Vidales Contreras
Subdirector de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta aquí.

A mis padres Adriana López Posada y Erberto de Jesús Ibarra Zarazúa, por ser mis ejemplos por seguir, por permitirme realizar mis estudios profesionales, por su amor, apoyo y comprensión todo el tiempo, por ser ustedes.

A mis hermanos Erberto y Ricardo, por su apoyo moral y profesional durante mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de Doctorado.

A mi Alma Máter la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por brindarme un lugar para culminar mis estudios de Posgrado.

A la Facultad de Agronomía UANL, por permitirme realizarme profesionalmente en mis estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía, UANL, que fueron mi segundo hogar y los espacios donde se llevó a cabo el inicio, desarrollo y culminación de la investigación doctoral.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL), por el apoyo económico para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías, por confiar en mí para culminar mis estudios de Posgrado, por su amistad, su apoyo y comprensión dentro y fuera de la Universidad, así como sus valiosos conocimientos y consejos brindados durante mi desarrollo profesional.

Al PhD. Héctor Lozoya Saldaña, por formar parte de mi comité de tesis, por su apoyo y consejos brindados durante la realización de esta investigación.

Al PhD. Emilio Olivares Sáenz, integrante de mi comité de tesis, por sus acertadas contribuciones al escrito de tesis y diseños experimentales.

Al Dr. José Elías Treviño Ramírez, por la participación en mi comité de tesis y por su apoyo en la revisión de la tesis, así como sus sugerencias y aportaciones a la investigación.

Al PhD. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado, integrante de mi comité doctoral, por sus contribuciones al desarrollo del escrito de tesis.

Al PhD. Alejandro Sergio del Bosque González, director de la Facultad de Agronomía, UANL, por contribuir con apoyo económico para la participación en congresos, derivados del desarrollo de la investigación doctoral.

A la Dra. Juana Aranda Ruíz, al Dr. Gerardo Méndez Zamora y al Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez, profesores de la Facultad de Agronomía, UANL, por ser instructores en el desarrollo de esta investigación desde el inicio de mis estudios de Doctorado.

A Gonzalo Martínez Peña y Gloria Peña Luna, por ser unas extraordinarias personas, por su amistad, consejos y apoyo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio y doctorado: Jaime Cavazos, Elisa Juárez, Nimbe Carbajal, Héctor Pérez, Uziel Grajeda, Karla Gómez, Heberto Rodas, Cyndi Rojas, Iván Martínez y Edgar Galaviz por su amistad, sus enseñanzas y consejos que me dieron.

Al Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez, responsable de la Unidad de Bioimagen del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), UANL, por su apoyo y orientación en el proceso de los cortes histológicos de las especies vegetales.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
ÍNDICE DE CUADROS	xviii
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	xxii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxvi
ÍNDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE.....	xxx
ABREVIATURAS.....	xxxii
CAPÍTULO 1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS RECURSOS FORESTALES Y LA IMPLEMENTACIÓN DE ALTERNATIVAS PARA SU MEJORA	1
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1 Problemática de los Recursos Forestales	6
4.1.1 Mundial.....	6
4.1.2 Nacional	6
4.1.3 Estatal	6
4.2 Reforestación.....	7

4.3	Diversidad Genética en Especies Forestales	8
4.4	Usos e Importancia de Especies Fabáceas.....	9
4.5	Propagación Tradicional de Fabáceas	9
4.6	Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales.....	10
4.7	Embriogénesis Somática	11
4.8	Etapas de la Embriogénesis Somática	12
4.8.1	Inducción de los Cultivos Embriogénicos.....	12
4.8.2	Proliferación de los Cultivos Embriogénicos	12
4.8.3	Pre-maduración de Embriones Somáticos.....	13
4.8.4	Maduración de Embriones Somáticos.....	13
4.8.5	Regeneración de Plantas	14
4.9	Factores que Afectan la Embriogénesis Somática	15
4.9.1	Explante	15
4.9.2	Medio de Cultivo.....	15
4.9.3	Reguladores de Crecimiento Vegetal.....	16
4.9.4	Subcultivo Selectivo	17
4.10	Embriogénesis Somática en Especies Fabáceas.....	18
4.10.1	Importancia de la Embriogénesis Somática en Fabáceas.....	18
5.	BIBLIOGRAFÍA	20
CAPÍTULO 2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE		
ÉBANO (<i>Ebenopsis ebano</i> [BERLAND.] BARNEBY & J.W. GRIMES).....		
		26

1.	RESUMEN	26
2.	ABSTRACT	28
3.	INTRODUCCIÓN	30
3.1	Hipótesis	31
3.1.1	Hipótesis General.....	31
3.1.2	Hipótesis Específicas	31
3.2	Objetivos	32
3.2.1	Objetivo General	32
3.2.2	Objetivos Específicos	32
4.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	34
4.1	Clasificación y Descripción Botánica de <i>Ebenopsis ebano</i> (Berland.) Barneby & J.W. Grimes	34
4.1.1	Clasificación Taxonómica.....	35
4.1.2	Descripción Botánica.....	35
4.2	Usos e Importancia de <i>Ebenopsis ebano</i>	37
4.3	Propagación Tradicional de <i>Ebenopsis ebano</i>	37
4.4	Embriogénesis Somática en Tribu Ingeae	38
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1	Localización del Estudio	39
5.2	Material Vegetal	39
5.3	Desinfestación	39

5.4	Preparación del Medio de Cultivo	40
5.4.1	Establecimiento	40
5.4.2	Inducción de Callo Embriogénico	42
5.4.3	Proliferación de Callo Embriogénico	42
5.4.4	Maduración de Embriones Somáticos.....	43
5.4.5	Germinación de Embriones Somáticos	43
5.5	Contenido de Humedad en Embriones Somáticos	44
5.6	Histología	44
5.7	Diseño Experimental	45
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1	Establecimiento.....	47
6.2	Inducción de Callo Embriogénico	48
6.3	Maduración de Embriones Somáticos	54
6.4	Contenido de Humedad en Embriones Somáticos	63
6.5	Histología	66
6.6	Germinación de Embriones Somáticos.....	68
7.	CONCLUSIONES	73
8.	RECOMENDACIONES.....	74
9.	BIBLIOGRAFÍA	76
CAPÍTULO 3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE HUIZACHE (<i>Vachellia farnesiana</i> [L.] WIGHT & ARN.)		83

1.	RESUMEN	83
2.	ABSTRACT	85
3.	INTRODUCCIÓN	87
3.1	Hipótesis	88
3.1.1	Hipótesis General.....	88
3.1.2	Hipótesis Específicas	88
3.2	Objetivos	89
3.2.1	Objetivo General	89
3.2.2	Objetivos Específicos	89
4.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	91
4.1	Clasificación y Descripción Botánica de <i>Vachellia farnesiana</i> (L.) Wight & Arn.....	91
4.1.1	Clasificación Taxonómica.....	92
4.1.2	Descripción Botánica.....	92
4.2	Usos e Importancia de Acacias	94
4.3	Propagación Tradicional de Acacias.....	95
4.4	Embriogénesis Somática en Acacias.....	95
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	98
5.1	Localización del Estudio	98
5.2	Material Vegetal	98
5.3	Desinfestación	98

5.4	Preparación del Medio de Cultivo	99
5.4.1	Establecimiento	99
5.4.2	Inducción de Callo Embriogénico	101
5.4.3	Proliferación de Callo Embriogénico	101
5.4.4	Maduración de Embriones Somáticos.....	102
5.4.5	Germinación de Embriones Somáticos	102
5.5	Contenido de Humedad en Embriones Somáticos	103
5.6	Histología	103
5.7	Diseño Experimental	104
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
6.1	Establecimiento.....	106
6.2	Inducción de Callo Embriogénico	107
6.3	Maduración de Embriones Somáticos	112
6.4	Contenido de Humedad en Embriones Somáticos	121
6.5	Histología	123
6.6	Germinación de Embriones Somáticos.....	126
7.	CONCLUSIONES	130
8.	RECOMENDACIONES.....	131
9.	BIBLIOGRAFÍA	132
CAPÍTULO 4. INDUCCIÓN DE CALLO <i>in vitro</i> EN MEZQUITE (<i>Prosopis glandulosa</i> TORR.).....		138

1.	RESUMEN	138
2.	ABSTRACT	140
3.	INTRODUCCIÓN	142
3.1	Hipótesis	144
3.1.1	Hipótesis General.....	144
3.1.2	Hipótesis Específicas	144
3.2	Objetivos	144
3.2.1	Objetivo General	144
3.2.2	Objetivos Específicos	144
4.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	146
4.1	Clasificación y Descripción Botánica de <i>Prosopis glandulosa</i> Torr.	146
4.1.1	Clasificación Taxonómica.....	147
4.1.2	Descripción Botánica.....	147
4.2	Usos e Importancia de <i>Prosopis glandulosa</i>	149
4.3	Propagación Tradicional de Mezquites.....	149
4.4	Organogénesis y Embriogénesis Somática en Mezquites.....	150
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	152
5.1	Localización del Estudio	152
5.2	Material Vegetal	152
5.3	Desinfestación	152
5.4	Preparación del Medio de Cultivo	153

5.4.1	Establecimiento	153
5.4.2	Inducción de Callo <i>in vitro</i>	155
5.4.3	Proliferación de Callo <i>in vitro</i>	156
5.5	Diseño Experimental.....	156
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	158
6.1	Establecimiento.....	158
6.2	Inducción de Callo <i>in vitro</i>	159
6.2.1	Experimento 1	159
6.2.2	Experimento 2	160
6.2.3	Experimento 3	161
6.3	Proliferación de Callo <i>in vitro</i>	165
7.	CONCLUSIONES	167
8.	RECOMENDACIONES.....	168
9.	BIBLIOGRAFÍA	169
CAPÍTULO 5. INDUCCIÓN DE CALLO <i>in vitro</i> RETAMA (<i>Parkinsonia aculeata</i>		
L.).....		
1.	RESUMEN	175
2.	ABSTRACT	177
3.	INTRODUCCIÓN	179
3.1	Hipótesis	180
3.1.1	Hipótesis General.....	180

3.1.2	Hipótesis Específicas	180
3.2	Objetivos	181
3.2.1	Objetivo General	181
3.2.2	Objetivos Específicos	181
4.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	182
4.1	Clasificación y Descripción Botánica de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.....	182
4.1.1	Clasificación Taxonómica.....	183
4.1.2	Descripción Botánica.....	183
4.2	Usos e Importancia de <i>Parkinsonia aculeata</i>	185
4.3	Propagación Tradicional del Género <i>Parkinsonia</i>	186
4.4	Cultivo <i>in vitro</i> en Tribu Caesalpinieae	186
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	188
5.1	Localización del Estudio	188
5.2	Material Vegetal	188
5.3	Desinfestación	188
5.4	Preparación del Medio de Cultivo	189
5.4.1	Establecimiento	189
5.4.2	Inducción de Callo <i>in vitro</i>	191
5.4.3	Proliferación de Callo <i>in vitro</i>	191
5.5	Diseño Experimental.....	191
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	193

6.1	Establecimiento.....	193
6.2	Inducción de Callo <i>in vitro</i>	194
6.3	Proliferación de Callo <i>in vitro</i>	196
7.	CONCLUSIONES.....	200
8.	RECOMENDACIONES.....	201
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	202
	APÉNDICE.....	208

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efecto de las concentraciones de NaClO en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de <i>E. ebano</i> , en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.....	47
2	Efecto individual de la concentración de 2,4-D y AC, tipo de medio de cultivo y condiciones de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	50
3	Efecto de la interacción de la concentración de 2,4-D y tipo de medio de cultivo, en la inducción de callo embriogénico en explantes de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	51
4	Efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	52

5	Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	56
6	Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	57
7	Variación en el contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de la etapa de maduración de <i>E. ebano</i>	65
8	Efecto de los reguladores BAP y AG ₃ a cuatro semanas del subcultivo, en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , de cuatro y ocho semanas de maduración.....	70
9	Efecto del medio de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis en semillas inmaduras de <i>V. farnesiana</i> , en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.....	107
10	Efecto individual de la concentración de 2,4-D y KIN, tipo de medio de cultivo y condiciones de incubación, en la inducción de callo embriogénico de explantes de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	109
11	Efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo	

	embriogénico en explantes de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	110
12	Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	115
13	Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	116
14	Variación en el contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de la etapa de maduración de <i>V. farnesiana</i>	122
15	Efecto de los reguladores BAP y AG ₃ a cuatro semanas del subcultivo, en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , de cuatro y ocho semanas de maduración.....	127
16	Efecto del medio de cultivo en la callogénesis de semillas inmaduras de <i>P. glandulosa</i> , en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.....	158
17	Efecto de 2,4-D/BAP en la formación de callo <i>in vitro</i> en explantes de <i>P. glandulosa</i> , a cuatro y ocho semanas del subcultivo.....	163

18	Efecto del medio de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis en semillas inmaduras de <i>P. aculeata</i> , en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.....	194
19	Efecto de 2,4-D/BAP en la formación de callo <i>in vitro</i> en explantes de <i>P. aculeata</i> , a cuatro y ocho semanas del subcultivo.....	196

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
1A	Componentes del medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962).....	213
2A	Componentes del medio de cultivo DCR (Gupta and Durzan, 1985).....	214
3A	Componentes del medio de cultivo GD (Gresshoff and Doy, 1972).....	215
4A	Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaClO, en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de <i>E. ebano</i> , a cuatro semanas de la siembra.....	216
5A	Análisis factorial del efecto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	216
6A	Análisis de varianza del efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	217

7A	Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	217
8A	Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	218
9A	Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de <i>E. ebano</i> , de los tratamientos de maduración.....	218
10A	Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de <i>E. ebano</i> , de los tratamientos control y con PEG de la etapa de maduración.....	219
11A	Análisis de varianza del efecto de BAP y AG ₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , de cuatro semanas de maduración.....	219
12A	Análisis de varianza del efecto de BAP y AG ₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , de ocho semanas de maduración.....	219
13A	Análisis de varianza del efecto de los medios de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas de la siembra.....	220
14A	Análisis factorial del efecto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de	

	callo embriogénico en explantes de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	220
15A	Análisis de varianza del efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	221
16A	Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , a cuatro semanas del subcultivo.....	221
17A	Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , a ocho semanas del subcultivo.....	222
18A	Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i> , de los tratamientos de maduración.....	222
19A	Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i> , de los tratamientos control y con PEG de la etapa de maduración.....	223
20A	Análisis de varianza del efecto de BAP y AG ₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , de cuatro semanas de maduración.....	223

21A	Análisis de varianza del efecto de BAP y AG ₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , de ocho semanas de maduración.....	223
22A	Análisis de varianza del efecto de los medios de cultivo en la callogénesis de semillas inmaduras de <i>P. glandulosa</i> , a cuatro semanas de la siembra.....	224
23A	Análisis de varianza del efecto de 2,4-D/BAP en la inducción de callo <i>in vitro</i> en explantes de <i>P. glandulosa</i> , a cuatro y ocho semanas del subcultivo.....	224
24A	Análisis de varianza del efecto de los medios de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de <i>P. aculeata</i> , a cuatro semanas de la siembra.....	224
25A	Análisis de varianza del efecto de 2,4-D/BAP en la inducción de callo <i>in vitro</i> en explantes de <i>P. aculeata</i> , a cuatro y ocho semanas del subcultivo.....	225

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pasos de la regeneración <i>in vitro</i> por embriogénesis somática (ES).....	15
2	Características taxonómicas de <i>Ebenopsis ebano</i>	34
3	Proceso de desinfestación de semillas de <i>E. ebano</i>	41
4	Efecto de las concentraciones de NaClO en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de <i>E. ebano</i>	48
5	Inducción de callo embriogénico en <i>E. ebano</i>	53
6	Efecto de los tratamientos de inducción en explantes de <i>E. ebano</i>	54
7	Etapas de proliferación y pre-maduración de embriones somáticos de <i>E. ebano</i>	58
8	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>E. ebano</i>	59
9	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>E. ebano</i>	60
10	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>E. ebano</i>	61

11	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>E. ebano</i>	62
12	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>E. ebano</i>	63
13	Efecto de las concentraciones de PEG en la maduración de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> , en relación con el peso fresco, peso seco y contenido de humedad.....	66
14	Cortes histológicos de callos embriogénicos de <i>E. ebano</i> en la etapa de maduración.....	68
15	Efecto de BAP y AG ₃ en la germinación de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> de un mes de maduración.....	71
16	Efecto de BAP y AG ₃ en la germinación de embriones somáticos de <i>E. ebano</i> de dos meses de maduración.....	72
17	Características taxonómicas de <i>Vachellia farnesiana</i>	91
18	Proceso de desinfestación de semillas de <i>V. farnesiana</i>	100
19	Efecto de los medios de cultivo en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de <i>V. farnesiana</i>	107
20	Inducción de callo embriogénico en <i>V. farnesiana</i>	111
21	Etapas de proliferación y pre-maduración de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i>	114
22	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i>	117

23	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i>	118
24	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i>	119
25	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i>	120
26	Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i>	121
27	Efecto de las concentraciones de PEG en la maduración de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> , en relación con el peso fresco, peso seco y contenido de humedad.....	123
28	Cortes histológicos de callos embriogénicos de <i>V. farnesiana</i> en la etapa de maduración.....	125
29	Efecto de BAP y AG ₃ en la germinación de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> de un mes de maduración.....	128
30	Efecto de BAP y AG ₃ en la germinación de embriones somáticos de <i>V. farnesiana</i> de dos meses de maduración.....	129
31	Características taxonómicas de <i>Prosopis glandulosa</i>	146
32	Proceso de desinfestación de semillas de <i>P. glandulosa</i>	154
33	Efecto de los medios de cultivo en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de <i>P. glandulosa</i>	159
34	Efecto de los tratamientos de inducción del Experimento 1 en explantes de <i>P. glandulosa</i>	160

35	Efecto de los tratamientos de inducción del Experimento 2 en explantes de <i>P. glandulosa</i>	161
36	Efecto de los tratamientos de inducción del Experimento 3 en explantes de <i>P. glandulosa</i> a ocho semanas del subcultivo.....	164
37	Efecto del medio de proliferación en explantes de <i>P. glandulosa</i> a 12 semanas del subcultivo.....	166
38	Características taxonómicas de <i>Parkinsonia aculeata</i>	182
39	Proceso de desinfestación de semillas de <i>P. aculeata</i>	190
40	Efecto de los medios de cultivo en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de <i>P. aculeata</i>	194
41	Efecto de los tratamientos de inducción en semillas inmaduras de <i>P. aculeata</i> a ocho semanas del subcultivo.....	197
42	Efecto de los tratamientos de inducción en semillas inmaduras de <i>P. aculeata</i> a ocho semanas del subcultivo.....	198
43	Efecto del medio de proliferación en explantes de <i>P. aculeata</i> a 10 semanas del subcultivo.....	199

ÍNDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE

Figura		Página
1A	Diagrama de pasos de la embriogénesis somática y regeneración <i>in vitro</i> de <i>E. ebano</i>	209
2A	Diagrama de pasos de la embriogénesis somática y regeneración <i>in vitro</i> de <i>V. farnesiana</i>	210
3A	Diagrama de pasos de la inducción de callo <i>in vitro</i> de <i>P. glandulosa</i>	211
4A	Diagrama de pasos de la inducción de callo <i>in vitro</i> de <i>P. aculeata</i>	212

ABREVIATURAS

MS	Murashige and Skoog, 1962
DCR	Gupta and Durzan, 1985
GD	Gresshoff and Doy, 1972
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido indolacético
AG ₃	Ácido giberélico
BAP	6-bencilaminopurina
KIN	Kinetina
TDZ	Thidiazuron
ABA	Ácido abscísico
AC	Agua de coco
CH	Caseína hidrolizada
CA	Carbón activado
PEG	Polietilenglicol
NaClO	Hipoclorito de sodio
KOH	Hidróxido de potasio
HCl	Ácido clorhídrico

PVP	Polivinilpirrolidona
Tween-20	Polisorbato 20
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligramo
g	Gramo
kg	Kilogramo
t	Tonelada
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
μm	Micra
mm	Milímetro
cm	Centímetro
m	Metro
ha	Hectárea
μM	Micromolar
mL L^{-1}	Mililitro por litro
mg L^{-1}	Miligramo por litro
g L^{-1}	Gramo por litro
kg cm^{-2}	Kilogramo por centímetro
v/v	Volumen sobre volumen
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius

%	Porcentaje
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
FV	Fuentes de variación
GL	Grados de libertad
CM	Cuadrado medio
F	F calculada
Sig	Significancia
ES	Embriogénesis somática

CAPÍTULO 1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS RECURSOS FORESTALES Y LA IMPLEMENTACIÓN DE ALTERNATIVAS PARA SU MEJORA

1. RESUMEN

En las últimas décadas el área total de bosque en el mundo ha disminuido considerablemente, principalmente para su transformación en zonas agrícolas, urbanas e industriales. México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en biodiversidad, sin embargo, el aumento de la población y la expansión agrícola e industrial han deteriorado los ecosistemas, entre estos el matorral xerófilo, debido a su amplia distribución. Diferentes comisiones gubernamentales realizan programas de reforestación y restauración ecológica, no obstante, es necesario implementar programas de conservación con especies de bajo aprovechamiento, ya que pudieran estar en un proceso de deterioro genético. La biotecnología vegetal ofrece diversas herramientas como el cultivo de tejidos vegetales, que tiene como ventaja la propagación a gran escala de plantas, en condiciones controladas y espacios reducidos; dentro de sus técnicas se encuentra la embriogénesis somática, la cual permite la generación de células embriogénicas a partir de células somáticas; y actualmente la regeneración de plantas por esta vía es la más adecuada para la propagación clonal de especies forestales, sin embargo, su implementación solo ha sido dirigida a un reducido grupo de especies vegetales. Por lo anterior, el objetivo de este capítulo está dirigido a evidenciar la problemática actual de los recursos forestales, así como sus alternativas y los métodos de propagación tradicional y

mediante cultivo de tejidos vegetales en especies fabáceas por medio de la técnica de embriogénesis somática.

2. ABSTRACT

In recent decades the total area of forest in the world has decreased considerably, mainly for its transformation into agricultural, urban and industrial areas. Mexico ranks fourth worldwide in biodiversity, however, population growth and agricultural and industrial expansion have deteriorated ecosystems, including the xerophilous scrub, due to its wide distribution. Different government commissions carry out reforestation and ecological restoration programs, however, it is necessary to implement conservation programs with low-use species, since they may be in a process of genetic deterioration. Plant biotechnology offers various tools such as the plant tissue culture, which has the advantage of large-scale propagation of plants under controlled conditions and small spaces; within its techniques the somatic embryogenesis allows the generation of embryogenic cells from somatic cells; and currently the regeneration of plants in this way is the most appropriate for the clonal propagation of forest species, however, its implementation has only been directed to a small group of plant species. Therefore, the objective of this chapter is aimed at highlighting the current problems of forest resources, as well as their alternatives and methods of traditional propagation and by plant tissue culture in fabaceous species through the technique of somatic embryogenesis.

3. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el área total de bosque es superior a 4,000 millones de hectáreas, lo que corresponde a un promedio de 0,6 hectáreas per cápita. Sin embargo, en la última década cerca de 13 millones de hectáreas de bosque se transformaron para otros usos, especialmente agrícolas, o se perdieron por causas naturales (FAO, 2010a).

México cuenta con una gran riqueza de recursos naturales y diversidad biológica, que lo posiciona entre los países con mayor biodiversidad y riqueza ecológica a nivel mundial, sin embargo, sufre de graves problemas ambientales, como la sobreexplotación y contaminación de acuíferos, extinción de especies y pérdida de biodiversidad, contaminación y degradación de suelos, polución y, como de mayor relevancia, la deforestación (Céspedes-Flores y Moreno-Sánchez, 2010). Durante el periodo comprendido entre 2002 y 2007, la superficie forestal estimada paso de 146, 118,323 ha a 144, 529,211 ha, siendo la vegetación de tipo matorral xerófilo la que presentó la mayor pérdida en superficie (FAO, 2010b; FAO y CONAFOR, 2011).

En la última década, se ha visto la necesidad de reforestar áreas perturbadas con especies nativas, tomando en cuenta los aspectos biológicos y sociales, y de esta manera derivar nuevas formas de obtener bienes y servicios forestales (Hall *et al.*, 2011); por ello, es importante enfocar esfuerzos en la conservación de estas especies, considerando que sean de amplia distribución, representativas de los diferentes ecosistemas, y con un alto valor económico, social y ecológico en México (FAO y CONAFOR, 2011). Cabe señalar que los esfuerzos realizados al respecto se enfocan

principalmente en especies amenazadas (SEMARNAT, 2010), cuando también se requiere en especies de bajo aprovechamiento, debido a que pueden estar en un proceso de deterioro genético (FAO y CONAFOR, 2011).

Debido a lo anterior, México cuenta con bancos y centros de germoplasma forestal alrededor de toda la república, especializados en el almacenamiento a mediano plazo, principalmente por semillas. Por el contrario, la conservación de germoplasma en su modalidad de polen o tejidos vegetales se ha desarrollado de manera incipiente (FAO y CONAFOR, 2011), por lo que es necesario implementar y desarrollar métodos alternativos para la propagación y conservación de los recursos forestales haciendo uso de la biotecnología vegetal.

Dentro de las herramientas de la biotecnología vegetal se encuentra la embriogénesis somática, proceso por el cual las células somáticas se diferencian en embriones somáticos (George *et al.*, 2008; Bhojwani and Dantu, 2013).

La embriogénesis somática en especies de los géneros *Prosopis* y *Acacia*, se ha llevado a cabo exitosamente mediante diferentes fuentes de explantes, medios de cultivo y concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (Garg *et al.*, 1996; Arce and Medina, 1997; Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000; Lakshmanan and Taji, 2000; Vengadesan *et al.*, 2002; Quoirin, 2003; Buendía-González *et al.*, 2007; Bhansali, 2010; Buendía-González *et al.*, 2012; Rathore *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo particular del presente capítulo es demostrar un panorama general de la problemática de los recursos forestales a nivel mundial, nacional y estatal, sus alternativas y los métodos de propagación tradicional y mediante cultivo de tejidos vegetales en especies fabáceas por medio de la técnica de embriogénesis somática.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Problemática de los Recursos Forestales

4.1.1 Mundial

La FAO (Food and Agriculture Organization) en 2010 calcula el área total de bosque del mundo en más de 4 000 millones de ha. Sin embargo, esta área de bosque no está distribuida de manera homogénea, siendo los países con mayor riqueza forestal, la Federación de Rusia, Brasil, Canadá, Estados Unidos de América y China, con más de la mitad del área total de bosques. No obstante, cerca de 13 millones de ha de bosque se han transformado para otros usos, especialmente agrícolas, o se perdieron de manera natural en la última década, donde Australia registra las mayores pérdidas desde el año 2000, debido a graves sequías e incendios forestales.

4.1.2 Nacional

México se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial en biodiversidad y endemismo (Mittermeir *et al.*, 1998). Hasta 2007, la superficie forestal en el país era de 144, 529,211 ha, teniendo una pérdida de 1, 589,112 ha desde el año 2002, destacando la vegetación de tipo matorral xerófilo con las mayores pérdidas, debido a su amplia representación en el país (FAO, 2010b).

4.1.3 Estatal

La superficie territorial del estado de Nuevo León es de 6, 361,021 ha que representa un 3.3 % de la superficie del país, de las cuales 5, 196,346 ha están consideradas como superficie forestal, ubicándose en el décimo lugar a nivel nacional y representando un 81.68 % del total de la superficie total del estado. La vegetación forestal del estado constituye, en su mayoría en vegetación de zonas áridas en 71.41 % y, en menor proporción bosques con un 5.48 % (CONAFOR, 2007).

En Nuevo León el aprovechamiento de los recursos forestales se concentra en la madera de coníferas y latifoliadas, en las áreas templadas de las partes altas de la Sierra Madre Oriental, así como en el aprovechamiento de otras maderas preciosas consideradas como comunes tropicales, específicamente mezquite y ébano. (CONAFOR, 2007).

Los municipios de Nuevo León con mayor volumen de producción forestal maderable en 2005 fueron: Galeana con 38.79 %, General Zaragoza con 19.55 %, Iturbide con 18.67 %, Aramberri con 8.55 % y China con 8.09 %, concentrándose el 93.65 % de la producción forestal del estado (CONAFOR, 2007).

4.2 Reforestación

La reforestación en México es una actividad forestal de gran importancia para restaurar y volver productivas las áreas deforestadas y degradadas. A pesar de todos los esfuerzos por parte de los sectores públicos y privados, los resultados no son del todo alentadores, dando como resultado sólo el 40 % de áreas reforestadas, con un nivel aceptable de supervivencia y calidad (Wightman y Cruz, 2003).

Por su parte, la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), reconoce 240 especies con potencial para la restauración ecológica y la

reforestación, de las cuales 233 son nativas y 7 exóticas (CONABIO, 2011). Por su parte, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), considera 85 especies importantes, definidas por su importancia económica, ecológica y social (CONAFOR, 2011).

Sin embargo, es importante enfocar esfuerzos en un menor número de especies para su conservación, considerando que sean de amplia distribución, representativas de los diferentes ecosistemas, y con un alto valor económico, social y ecológico en México (FAO, 2010b). A su vez, también se requiere implementar programas de conservación y restauración con especies de bajo aprovechamiento, ya que pudieran estar en un proceso de deterioro genético, lo que en el futuro pueden impactar en la obtención de recursos forestales (FAO, 2010a, 2010b).

De acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), los principales factores de deforestación y degradación de los recursos forestales en el estado de Nuevo León son el sobrepastoreo, la deforestación, la sobreexplotación de la cubierta vegetal, usos agrícolas sobreintensivos, desechos industriales, incendios y plagas forestales (SEMARNAT, 2006).

4.3 Diversidad Genética en Especies Forestales

En los últimos 200 años, los recursos genéticos de especies forestales se han transferido cada vez más, dentro y fuera de los rangos de distribución de las especies nativas, la silvicultura y de la investigación y el desarrollo. Este germoplasma transferido se ha desplegado para cultivar árboles por varios propósitos, los cuales van desde la producción de productos madereros y no madereros, a la prestación de servicios a los ecosistemas, como la restauración de los bosques para la conservación de la biodiversidad (Koskela *et al.*, 2014).

En México no existe una política nacional para realiza estudios y elaborar un inventario de la variación genética en especies arbóreas y arbustivas, y tampoco se han establecido mecanismos para dar continuidad a la perdida genética y vulnerabilidad de especies (FAO, 2010b).

En el país, actualmente se tienen registrados 37 bancos de germoplasma forestal para almacenamiento a mediano plazo, y 17 centros de almacenamiento temporal. Estos centros de germoplasma forestal se dedican principalmente al almacenamiento de semillas de especies forestales; mientras que la conservación de germoplasma en su modalidad de polen o tejidos vegetales se ha desarrollado de manera incipiente (FAO, 2010b).

4.4 Usos e Importancia de Especies Fabáceas

Las fabáceas son la tercera familia multipropósito más grande de plantas con flores, con más de 19,000 especies y distribuidas globalmente (Parrott *et al.*, 1995; Venkatachalam *et al.*, 2003). Algunas especies arbóreas de fabáceas son una buena fuente de comida, forraje, combustibles, resinas y colorantes; además de ser plantas con un alto valor en la agroforestería y de valor nutracéutico y medicinal. También tienen un importante papel en los ecosistemas naturales y cultivados, debido a su asociación con bacterias del género *Rhizobium*, lo cual mejora la fertilidad del suelo (Biswas *et al.*, 2011).

4.5 Propagación Tradicional de Fabáceas

En el caso particular de especies del género *Prosopis*, la producción de semillas es abundante y es el método tradicional de propagación. Al igual que otras fabáceas, las

semillas poseen una cubierta dura, por lo que un pretratamiento con algún tipo de ácido es recomendado. Sin embargo, desde que la hibridación natural ocurre en muchos sitios, el uso de semillas tiene el gran inconveniente de producir plantas con alta variabilidad en cuanto a productividad, fijación de nitrógeno, calidad de fruto, etc. (Arce and Medina, 1997).

La propagación vegetativa por esquejes e injerto, son los métodos más ampliamente utilizados para la multiplicación de árboles del género *Prosopis*. No obstante, las plantas obtenidas por medio de estos métodos son altamente dependientes de los factores externos y endógenos (Arce and Balboa, 1991; Arce and Medina, 1997).

Dentro las especies de *Prosopis*, existen algunos individuos con características excepcionales, que pueden tener resultados exitosos en programas de reforestación y en la recuperación de zonas devastadas (Arce and Medina, 1997).

Al igual que especies del género *Prosopis*, las Acacias también producen una alta cantidad de semillas, las cuales tienen un periodo de vida largo y son fáciles de almacenar. Sin embargo, también se presenta alta variabilidad genética, lo cual hace necesario el desarrollo de nuevos programas de propagación clonal (Quoirin, 2003).

4.6 Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales

Una de las herramientas vitales de la biotecnología vegetal es el cultivo *in vitro* de plantas, comúnmente llamado cultivo de tejidos vegetales o micropropagación, el cual se utiliza como ayuda experimental y permite la tecnología para la producción agrícola, el fitomejoramiento, la modificación de plantas, la producción de metabolitos vegetales, la manipulación genética y la rápida propagación clonal de plantas de acuerdo a las

necesidades deseadas, ya que requiere de espacios reducidos y poca mano de obra (Kumar and Loh, 2012; De Filippis, 2014).

4.7 Embriogénesis Somática

La embriogénesis es un modo especializado de desarrollo por el cual un óvulo fecundado, a través de una serie de patrones predeterminados de divisiones celulares y la diferenciación, forma un embrión, el precursor de la siguiente generación (Bhojwani and Dantu, 2013).

Los embriones formados por células somáticas son llamados embriones somáticos, y el proceso por el cual la célula somática se diferencia en un embrión es conocido como embriogénesis somática (ES) (Bhojwani and Dantu, 2013; Sahijram and Bahadur, 2015). Los embriones somáticos son parecidos a los embriones cigóticos morfológicamente; son bipolares y tienen los órganos embrionarios típicos, sin embargo, se desarrollan mediante una vía diferente (George *et al.*, 2008).

De acuerdo con Quiroz-Figueroa *et al.* (2006), la embriogénesis somática es el proceso por el cual células somáticas, bajo condiciones de inducción, generan células embriogénicas, las cuales a través de una serie de procesos morfológicos y bioquímicos resultan en la formación de un embrión somático. Al no ser la célula inicial producto de un proceso de recombinación y fusión de gametos, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante. Actualmente, la vía de regeneración para lograr una óptima propagación vegetativa, y que por tanto se considera como la más adecuada para la micropropagación de especies forestales, es la embriogénesis somática (Celestino *et al.*, 2005).

4.8 Etapas de la Embriogénesis Somática

La regeneración de plantas mediante la vía de embriogénesis somática incluye cinco etapas (George *et al.*, 2008; Bhojwani and Dantu, 2013):

4.8.1 Inducción de los Cultivos Embriogénicos

Las células somáticas dentro de la planta contienen toda la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de embriogénesis somática debe consistir entonces en la culminación de un patrón de expresión génica actual en el tejido del explante y su reemplazo con un programa de expresión de un gen embriogénico. También los reguladores de crecimiento vegetal y el estrés desempeñan un papel central en la expresión génica. Esto resulta en una serie de divisiones celulares que inducen un crecimiento organizado o desorganizado de células y posteriormente callos, que conduce a la embriogénesis somática. Está claro que el inicio de embriogénesis somática está restringido solo a ciertas células receptoras que tienen el potencial de activar los genes involucrados en la generación de células embriogénicas. Solo unas pocas células del explante primario son competentes para la inducción embriogénica, proceso que resulta de la sensibilidad de estas células a las auxinas.

4.8.2 Proliferación de los Cultivos Embriogénicos

Una vez que se forman las células embriogénicas, continúan proliferando formando masas proembriogénicas. Las auxinas son requeridas para la proliferación de estas masas, pero son inhibitorias para el desarrollo de estas masas en embriones somáticos. El grado de diferenciación en el embrión varía en cada especie. Además,

el efecto de la auxina en el medio de cultivo comienza a agotarse a los pocos días, por lo que deben realizarse subcultivos cada semana para iniciar el desarrollo de los embriones somáticos. Los cultivos pueden mantenerse y aumentarse en medio semisólido, sin embargo, para la propagación a gran escala se utilizan cultivos en suspensión.

4.8.3 Pre-maduración de Embriones Somáticos

Comprende el vínculo entre la proliferación de las masas proembriogénicas y el desarrollo embrionario organizado. En muchas especies es común que la incapacidad de muchas líneas celulares embriogénicas para formar embriones somáticos bien desarrollados se debe en gran medida por proembriones perturbados. Para estimular un mayor crecimiento de los embriones somáticos es necesario transferir los cultivos embriogénicos a medio sin auxinas.

4.8.4 Maduración de Embriones Somáticos

Durante la etapa de maduración, los embriones somáticos se someten a cambios morfológicos y bioquímicos. En esta etapa, los cotiledones se expanden con la deposición de materiales de almacenamiento, la represión de germinación y la adquisición de tolerancia a la desecación. Los embriones somáticos acumulan productos de almacenamiento que exhiben las mismas características que las de los embriones cigóticos. En algunas especies es necesario tratar los cultivos embriogénicos con ácido abscísico (ABA), para estimular la maduración. la maduración de los embriones de semilla es caracterizada por finalizar con cierto grado de secado, lo que resulta en una reducción gradual del metabolismo a medida que se

pierde el agua desde el tejido de la semilla y el embrión pasa a un estado metabólicamente inactivo. Diferentes agentes osmóticos como aminoácidos y azúcares, así como compuestos de alto peso molecular como polietilenglicol (PEG), pueden proporcionar al medio de cultivo un bajo potencial osmótico.

4.8.5 Regeneración de Plantas

La embriogénesis somática es un proceso complejo donde la calidad del producto final es la supervivencia y crecimiento de plantas regeneradas, y depende de las condiciones proporcionadas en etapas anteriores, permitiendo a los embriones somáticos formarse, madurar y finalmente germinar. Solo aquellos embriones maduros que han acumulado suficientes materiales de almacenamiento y tolerancia a la desecación adquirida al final de la maduración se convertirán en plantas normales.

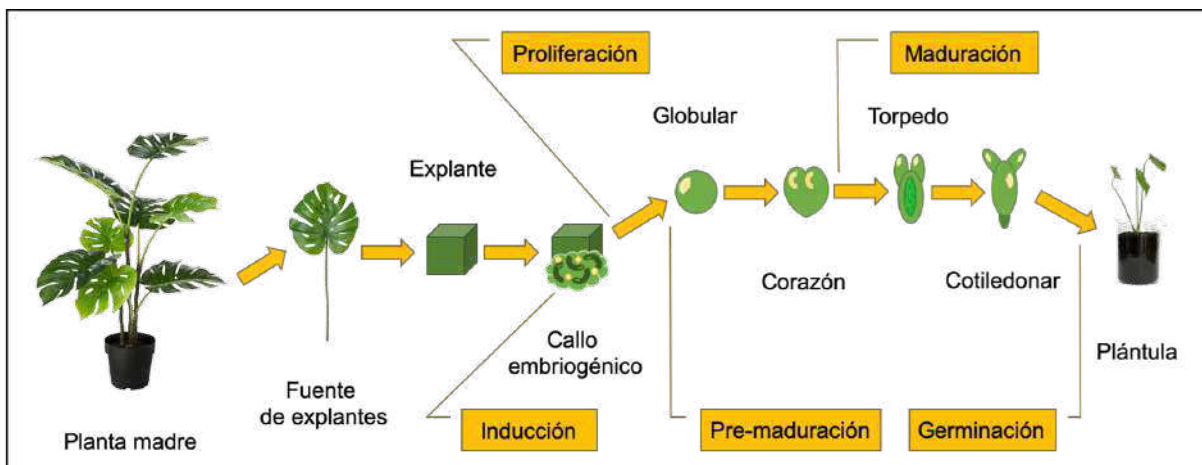


Figura 1. Pasos de la regeneración *in vitro* por embriogénesis somática (ES). Fuente: Ibarra-López (2018).

4.9 Factores que Afectan la Embriogénesis Somática

4.9.1 Explante

El éxito de la embriogénesis somática en un gran número de plantas ha sido, principalmente, debido a un cambio en el énfasis de la manipulación del medio hacia la selección del explante. La elección del explante para la producción de embriones somáticos es generalmente limitada a tejidos inmaduros o menos diferenciados como segmentos de hipocótilo, hojas jóvenes, secciones apicales embrionarias, piezas florales jóvenes y embriones cigóticos inmaduros. Los embriones cigóticos contienen células que ya poseen competencia embriogénica, denominadas células determinadas pre-embriogénicas (Bhojwani and Dantu, 2013).

4.9.2 Medio de Cultivo

En el 70 % de los casos exitosos de embriogénesis somática, el medio MS (Murashige and Skoog, 1962), y sus modificaciones es el más utilizado. La fuente de carbono más

usada en los medios de cultivo es la sacarosa, y esta interactúa con las concentraciones de auxina (Bhojwani and Dantu, 2013).

La forma de nitrógeno en el medio de cultivo afecta significativamente la embriogénesis somática *in vitro*, siendo las formas de nitrato (NO_3^-) las más recomendables. Otras fuentes de nitrógeno como la caseína hidrolizada (CH) y los aminoácidos también permite la formación de embriones somáticos (Sahijram and Bahadur, 2015).

4.9.3 Reguladores de Crecimiento Vegetal

4.9.3.1 Auxinas

La auxina más comúnmente utilizada para la inducción de la embriogénesis somática es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Otras auxinas que han demostrado promover la embriogénesis somática, aunque menos frecuente, son dicamba (ácido 3, 6-dicloro-2-metoxibenzoico), ácido propiónico, picloram, ácido indolacético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) (Smith, 2013).

4.9.3.2 Citocininas

Las citocininas pueden inducir un efecto promotorio en la inducción de la ES; entre las citocininas que se han utilizado están la zeatina, la 6-bencilaminopurina (BAP), kinetina y thidiazuron (TDZ) (Smith, 2013).

4.9.3.3 Giberelinas

La adición de giberelinas en los cultivos embriogénicos promueve el proceso de regeneración y la germinación de los embriones somáticos. Por lo general los compuestos más utilizados son el AG₁, AG₃, AG₄ y AG₇ (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

4.9.3.4 Otros

En ocasiones la combinación de los reguladores de crecimiento es necesaria para la inducción de ES. En algunos casos se utilizan combinaciones de auxinas con citocininas, auxinas con giberelinas y auxinas con suplementos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos, agua de coco (AC), caseína hidrolizada, etc., los cuales en concentraciones adecuadas pueden inducir el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos (Smith, 2013).

De igual manera destaca el uso de ABA, el cual comúnmente se utiliza en la maduración de los embriones somáticos, ya que está demostrado que inhibe la germinación precoz de los embriones y estimula la maduración coordinada de los embriones somáticos. Sin embargo, su prolongada exposición impide el crecimiento de las plántulas *in vitro* (George *et al.*, 2008; Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

4.9.4 Subcultivo Selectivo

Los explantes multicelulares son generalmente una mezcla de células que difieren en su potencial para formar embriones somáticos. Solo una pequeña proporción de estas células son capaces de expresar su totipotencia celular bajo un conjunto de condiciones de cultivo (Bhojwani and Dantu, 2013). Por lo tanto, los callos y cultivos en suspensión derivados de tales explantes también son heterogéneos con respecto al potencial embriogénico de sus células constituyentes. En algunas ocasiones, las

porciones embriogénicas del callo son distintas de los tejidos no embriogénicos en base de sus aspectos morfológicos, por lo que es esencial realizar subcultivos, para la regeneración de los tejidos (Sahijram and Bahadur, 2015).

4.10 Embriogénesis Somática en Especies Fabáceas

La inducción eficiente de la embriogénesis somática y la regeneración de plantas de la familia Fabaceae, está limitada a pocas especies (Parrott, 1992). En estas especies, la ES se ha realizado relativamente fácil mediante tejidos meristemáticos jóvenes, como embriones inmaduros y hojas en desarrollo (Lakshmanan and Taji, 2000).

Más recientemente, uno de los enfoques más prometedores es para introducir genes de interés en estas especies, sin embargo, la desventaja de este enfoque es la posible segregación fenotípica de las plantas derivadas de diferentes semillas, lo cual es un tema de importancia en fabáceas arbóreas (Hong and Bhatnagar, 2007).

4.10.1 Importancia de la Embriogénesis Somática en Fabáceas

Los sistemas de propagación *in vitro* tienen sus ventajas sobre la propagación tradicional, ya que el sistema *in vitro* determina fenotípica y genotípicamente propágulos uniformes libres de enfermedades de forma sustentable (Aitken-Christie *et al.*, 1995). La regeneración por embriogénesis somática ofrece un gran potencial para su uso en propagación masiva o en programas de mejoramiento genético, la cual ha sido aplicada exitosamente por lo general en miembros de la subfamilia Faboideae (Parrott *et al.*, 1995), no obstante, su implementación en especies leñosas ha sido bastante lenta (Gantait *et al.*, 2018). Por tanto, los mayores retos de esta técnica en especies fabáceas está dirigida a la mayor producción de embriones somáticos

maduros, alta tasa de germinación y conversión y la disminución de la variación somaclonal (Lakshmanan and Taji, 2000).

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken-Christie, J., T. Kozai and M. A. L. Smith. 1995. Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 574 p.
- Arce, J. P. and O. Balboa. 1991. Seasonality in rooting of *Prosopis chilensis* cuttings and *in vitro* micropropagation. For Ecol Manage 40:163-173.
- Arce, J. P. and M. C. Medina. 1997. Micropropagation of *Prosopis* species (mesquites). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in Agriculture Forestry, 39. High-Tech and Micropropagation V. Springer-Verlag, Berlin. pp. 367-380.
- Bhansali, R. R. 2010. Biology and multiplication of *Prosopis* species grown in the Thar Desert. In: Ramawat, K. G. (ed.). Desert Plants. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. pp. 371-406.
- Bhojwani, S. S. and P. K. Dantu. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India. 309 p.
- Biswas, B., P. T. Scott and P. M. Gresshoff. 2011. Tree legumes as feestock for sustainable biofuel production: Opportunities and challenges. Journal of Plant Physiology 168:1877-1884.
- Buendía-González, L., J. Orozco-Villafuerte, F. Cruz-Sosa, V. M. Chávez-Ávila, E. J. Vernon-Carter and R. J. Newton. 2007. Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd. M. C. Johnston. I. Via cotyledonary nodes. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43:260-266.

- Buendía-González, L., M. E. Estrada-Zúñiga, J. Orozco-Villafuerte, F. Cruz-Sosa and E. J. Vernon-Carter. 2012. Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 108:287-296.
- Cañedo-Ortiz, B. O., M. E. Pérez-Reyes and E. Pérez-Molphe-Balch. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A. schaffneri*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36:268-272.
- Celestino, C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest. Agrar. Sist. Recur For* 14:345-357.
- Céspedes-Flores, S. E. y E. Moreno-Sánchez. 2010. Estimación del valor de la pérdida de recurso forestal y su relación con la reforestación en las entidades federativas de México. *Investigación Ambiental* 2(2):5-13.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2011. Índice de especies. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/indice_especies.html.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2007. Diagnóstico del Sector Forestal del Estado de Nuevo León. Monterrey, N. L., México. 37 p.
- CONAFOR. 2011. Reforestación. Fichas técnicas. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temas-forestales/reforestacion/fichas-tecnicas>.
- De Filippis, L. F. 2014. Crop improvement through tissue culture. In: Ahmad P., M. R. Wani, M. M. Azooz and L. S. P. Tran (eds.). *Improvement of crops in the era of climatic changes*. Springer New York. pp. 289-346.

- FAO (Food and Agriculture Organization). 2010a. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Informe principal. Roma, Italia. pp. 339.
- FAO. 2010b. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010: informe nacional México. Departamento Forestal-FAO. Roma, Italia. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/al567S/al567S.pdf>.
- FAO y CONAFOR. 2011. Situación de los Recursos Genéticos Forestales en México. Informe Final del proyecto TCP/MEX/3301/MEX (4). 75 p.
- Gantait, S., S. Kundu and P. K. Das. 2018. *Acacia*: An exclusive survey on *in vitro* propagation. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 17:163-177.
- Garg, L., N. N. Bhandari, V. Rani and S. S. Bhojwani. 1996. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. Plant Cell Reports 15:855-858.
- George, E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. Plant propagation by Tissue Culture, 3rd ed. Volume 1. The Background. Springer, Netherlands. 501 p.
- Gutiérrez-Mora, A., A. G. González-Gutiérrez, B. Rodríguez-Garay, A. Ascencio-Cabral and L. Li-Wei. 2012. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. In: Sato, K. (ed.). Embryogenesis. InTech, Croatia. pp. 229-248.
- Hall, J. S., M. S. Ashton, E. J. Garen and S. Jose. 2011. The ecology and ecosystem services of native trees: Implications for reforestation and land restoration in Mesoamerica. Forest Ecology and Management 261:1553-1557.
- Hong, Y. and S. Bhatnagar. 2007. Tropical trees legumes. In: Pua, E. C. and M. R. Davey (eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry 60, Transgenic Crops V. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. pp. 407-431.

- Koskela, J., B. Vinceti, W. Dvorak, D. Bush, I. K. Dawson, J. Loo, E. D. Kjaer, C. Navarro, C. Padolina, S. Bordács, R. Jamnadass, L. Graudal and L. Ramamonjisoa. 2014. Utilization and transfer of forest genetic resources: A global review. *Forest Ecology and Management* 333:22-34.
- Kumar, P. P. and C. S. Loh. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. In: Altman, A. and P. M. Hasegawa (eds.). *Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century*. Elsevier. pp. 131-138.
- Lakshmanan, P. and A. Taji. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biol* 2:136-148.
- Mittermeir, R. A., N. Myers, J. B. Thomsen and G. A. B. Fonseca. 1998. Biodiversity hots post and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation Biology* 12:516-520.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Parrot, W. A., M. A. Bailey, R. E. Durham and H. V. Mathews. 1992. Tissue culture and regeneration of legumes. In: Moss, J. P. (ed.). *Proc. Int. Workshop on Biotechnology and Crop Improvement in Asia – ICRISAT*. Hyderabad, India. pp. 115-148.
- Parrott, W. A., R. E. Durham and M. A. Bailey. 1995. Somatic Embryogenesis in Legumes. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 31. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 199-227.

- Quiroz-Figueroa, F., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos and V. M. Vargas. 2006. Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86:285-301.
- Quoirin, M. 2003. Micropropagation of *Acacia* species. In: Jain, S. M. and K. Ishii (eds.). *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. pp. 245-268.
- Rathore, J. S., M. K. Rai and N. S. Shekhawat. 2012. Induction of somatic embryogenesis in gum Arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd.]. *Physiol Mol Biol Plants* 18(4):387-392.
- Sahijram, L. and B. Bahadur. 2015. Somatic embryogenesis. In: Bahadur, B., M. V. Rajam, L. Sahijram and K. V. Krishnamurthy (eds.). *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*. Springer India. pp. 315-328.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2006. Programa Estratégico Forestal para México. México. pp. 20-25.
- SEMARNAT. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos naturales.
- Smith, R. H. 2013. *Plant tissue culture. Techniques and experiments*. 3rd edition. Elsevier. pp. 45-62.
- Vengadesan, G., A. Ganapathi, V. R. Anbazhagan and R. P. Anand. 2002. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38:52-57.

- Venkatachalam, P., N. Geetha, P. Priya, N. Jayabalan and G. Lakshmi Sita. 2003. Somatic embryogenesis. In: Jaiwal, P. K. and R. P. Singh. (eds.). Improvement Strategies for Leguminosae Biotechnology. pp. 87-132.
- Wightman, K. E. y B. S. Cruz. 2003. La cadena de reforestación y la importancia en la calidad de las plantas. *Foresta Veracruzana* 5(1):45-51.

CAPÍTULO 2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN *in vitro* DE ÉBANO (*Ebenopsis ebano* [BERLAND.] BARNEBY & J.W. GRIMES)

1. RESUMEN

El ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes), es una fabácea nativa del sureste de Texas y noreste de México, cuya madera tiene múltiples usos, y su propagación natural se limita a la semilla botánica. La presente investigación describe el primer estudio de embriogénesis somática, con el objetivo de identificar componentes, dosis y condiciones de su inducción, como base para su posible regeneración y propagación masiva *in vitro*. Se establecieron semillas inmaduras de *E. ebano* en medio MS, las cuales se desinfectaron con tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO). Al final de la evaluación, la concentración de 1.62 % permitió bajos porcentajes de contaminación y oscurecimiento. De estas plántulas *in vitro*, se seleccionaron cotiledones inmaduros y el eje embrionario como explante para la inducción de callo embriogénico. Los explantes se sembraron en medios semisólido y líquido de las sales básicas MS más ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) (0.0-9.06 μ M) y 10 % de agua de coco (AC) e incubados en condiciones de fotoperiodo u oscuridad continua. La mayor generación de callo embriogénico sucedió con 9.06 μ M de 2,4-D y 10 % AC; mientras que su proliferación fue superior en medios semisólidos y en oscuridad. Para la fase de maduración, los callos embriogénicos se subcultivaron en un medio MS semisólido con ácido abscísico (ABA) (3.78-30.24 μ M), polietilenglicol 4000 (PEG) (3 y 6 %) o sacarosa (3-5 %). Las concentraciones de 4 y 5 % de sacarosa

y 3 y 6 % de PEG indujeron el mayor número de embriones somáticos totales en los tiempos evaluados, sin embargo, la frecuencia de maduración y mejor calidad de embriones (peso fresco y seco) fue superior con 6 % de PEG. Mediante análisis histológicos se confirmó la ontogenia, morfología y desarrollo de los embriones somáticos. Finalmente, los embriones somáticos maduros se transfirieron en tratamientos de germinación en un medio MS al 50 % más 6-bencilaminopurina (BAP) (2.22 y 4.44 μM) o ácido giberélico (AG_3) (1.45 y 2.89 μM). La germinación de los embriones fue superior con 2.22 μM de BAP, sin embargo, la generación de radícula en todos los tratamientos fue deficiente. Se concluye que para cada fase de la embriogénesis somática se requieren combinaciones específicas de los componentes del medio de cultivo y del ambiente de incubación, identificadas en el presente estudio.

2. ABSTRACT

Texas-ebony (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes), is a fabaceous native to southeastern Texas and northeastern Mexico, whose wood has multiple uses, and its natural propagation is limited to botanical seed. The present research describes the first study of somatic embryogenesis, with the objective of identifying components, doses and conditions of its induction, as a basis for its possible regeneration and massive propagation *in vitro*. Immature *E. ebano* seeds were established in MS medium, which were disinfested with three concentrations of sodium hypochlorite (NaClO). At the end of the evaluation, the concentration of 1.62 % allowed low percentages of pollution and darkening. From these *in vitro* seedlings, immature cotyledons and the embryonic axis were selected as an explant for the induction of embryogenic callus. The explants were seeded in semisolid and liquid media of the basic salts MS plus 2,4-diclofenoxyacetic acid (2,4-D) (0.0-9.06 μ M) and 10 % coconut water (CW) e incubated under continuous photoperiod or dark conditions. The largest generation of embryogenic callus occurred with 9.06 μ M of 2,4-D and 10 % CW; while its proliferation was superior in semisolid media and in darkness. For the maturation phase, the embryogenic calli were subcultured in a semisolid MS medium with abscisic acid (ABA) (3.78-30.24 μ M), polyethylene glycol 4000 (PEG) (3 and 6 %) or sucrose (3-5 %). The concentrations of 4 and 5 % of sucrose and 3 and 6 % of PEG induced the greatest number of total somatic embryos in the times evaluated, however, the frequency of maturation and better quality of embryos (fresh and dry weight) was higher

with 6 % of PEG. Histological analysis confirmed the ontogeny, morphology and development of somatic embryos. Finally, mature somatic embryos were transferred in germination treatments in 50 % MS medium plus 6-benzylaminopurine (BAP) (2.22 and 4.44 μM) or gibberellic acid (GA_3) (1.45 and 2.89 μM). The germination of the embryos was higher with 2.22 μM of BAP, however, the generation of radicle in all the treatments was deficient. It is concluded that specific combinations of the components of the culture medium and the incubation environment identified in the present study are required for each phase of somatic embryogenesis.

3. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el área total de bosque en el mundo ha disminuido de manera considerable, principalmente para la transformación de uso agrícola, urbano e industrial (FAO, 2010). En México, el ecosistema con mayor extensión es el matorral espinoso Tamaulipeco, distribuido generalmente en el noreste de país (Foroughbakhch *et al.*, 2009). Una de las familias típicas de este ecosistema es la familia Fabaceae, donde destacan géneros como *Acacia*, *Prosopis*, *Ebenopsis*, *Caesalpinia* y *Havardia* (Estrada y Marroquín de la Fuente, 1992).

El ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes), es una especie nativa del sureste de Texas y noreste de México, localizado principalmente en los estados de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila (Vires, 1986; Alanís, 1996). Su madera, debido a su dureza, se utiliza para la fabricación de postes, muebles, mangos para cuchillería fina y armazones de casas; también se utiliza como combustible, obteniendo carbón de alta calidad; además de su empleo como árbol de sombra y ornamental (Vires, 1986; González, 1996; Rechy-Carvajal y von Roth-Rechy, 2004). Conjuntamente, las semillas inmaduras son consumidas cocidas, y maduras tostadas sin la testa, o molidas como sustituto de café (Correll and Johnston, 1970; Estrada y Marroquín de la Fuente, 1992). Asimismo, se ha comprobado la actividad antimicrobiana de las semillas contra microorganismos de importancia clínica como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Candida albicans*, con resultados prometedores (Gómez-Flores *et al.*, 2009).

Esta especie se propaga por semilla, pero requiere de procesos de escarificación (Alaniz and Everitt, 1978), y aún cuando ya se comienza a incluir en viveros locales, presenta alta variabilidad genética en la progenie; por tanto, es indispensable desarrollar métodos alternativos para su propagación clonal. El cultivo de tejidos vegetales permite la obtención de un gran número de plantas uniformes en corto tiempo, bajo condiciones controladas y espacios reducidos (Kumar and Loh, 2012). Entre sus técnicas se encuentra la embriogénesis somática, proceso por el cual las células somáticas son inducidas a desarrollar células embriogénicas, que posteriormente experimentan cambios morfológicos y bioquímicos, para producir estructuras bipolares sin conexión vascular con el tejido embrionario (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Actualmente, no se cuenta con referencias sobre el empleo de embriogénesis somática para regenerar *in vitro* *E. ebano*.

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis General

La embriogénesis somática y regeneración *in vitro*, en ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes), se puede lograr mediante diferentes tipos de medio de cultivo, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, suplementos y condiciones de incubación.

3.1.2 Hipótesis Específicas

1. El establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *E. ebano*, se puede lograr mediante diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los agentes desinfectantes.

2. La inducción de callo embriogénico en semillas inmaduras de *E. ebano*, se puede lograr mediante diferentes tipos de medio de cultivo, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, suplementos y condiciones de incubación.
3. La maduración de callos embriogénicos de *E. ebano* se puede lograr mediante diferentes suplementos adicionados al medio de cultivo, en base a su concentración y tiempo de exposición.
4. Los cortes histológicos en callos embriogénicos de *E. ebano*, pueden demostrar el origen y patrón de desarrollo de los embriones somáticos.
5. La germinación de los embriones somáticos maduros de *E. ebano*, se puede lograr mediante diferentes concentraciones de BAP y AG₃ en el medio de cultivo.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Establecer las metodologías que permitan inducir la embriogénesis somática y regeneración *in vitro*, en ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes).

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los agentes desinfectantes, que permitan el establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *E. ebano*.
2. Determinar las concentraciones de 2,4-D/kinetina y suplementos, tipo de medio y condiciones de incubación, que permitan la inducción de callo embriogénico en semillas inmaduras de *E. ebano*.

3. Definir el tipo, concentración y tiempo de exposición de suplementos adicionados al medio de cultivo, para inducir la maduración de callos embriogénicos de *E. ebano*.
4. Demostrar mediante cortes histológicos la etapa de maduración en callos embriogénicos de *E. ebano*, sometidos a diferentes suplementos adicionados al medio de cultivo.
5. Determinar la concentración de BAP y AG₃, que permita la germinación de embriones somáticos maduros de *E. ebano*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Clasificación y Descripción Botánica de *Ebenopsis ebano* (Berland.)

Barneby & J.W. Grimes

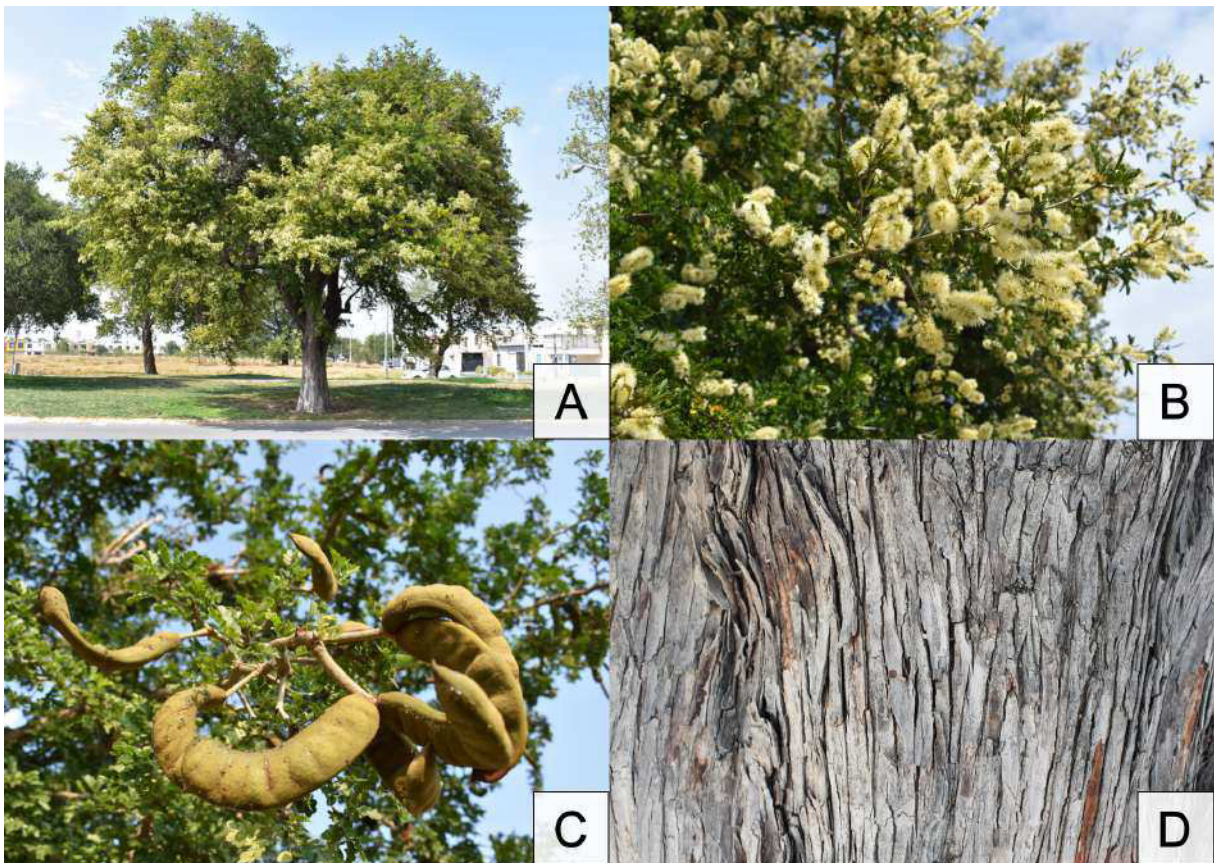


Figura 2. Características taxonómicas de *Ebenopsis ebano*. A) Árbol adulto de ébano en floración; B) Hojas e inflorescencias de ébano; C) Frutos inmaduros de ébano; D) Tallo y corteza de ébano adulto. Fuente: Ibarra-López (2018).

4.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Eudicotyledoneae
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Mimosoideae
Tribu:	Ingeae
Género:	<i>Ebenopsis</i>
Especie:	<i>Ebenopsis ebano</i>

Fuente: USDA (2006).

4.1.2 Descripción Botánica

4.1.2.1 Aspecto

Árboles de hasta 15 m de altura con una corona oscura, densa y redondeada. Muy apreciado como árbol ornamental y de sombra (Correll and Johnston, 1970) (Figura 2A).

4.1.2.2 Hojas

Alternas, compuestas, bipinnadas, de 2.5 a 4.2 cm de largo, pinas 2 o 3 pares por hojas, de 1 a 2.5 cm de largo, con 3 a 6 pares de folíolos por pinna, de 0.6 a 1.0 cm de largo por 0.4 a 0.5 cm de ancho. Forma oblonga a oblongo-obovadas o anchamente

obovadas, glabras y/o esparcidas y diminutamente ciliadas en los bordes; glándulas pediceladas presentes, una en cada inserción de pares de pinnas (Estrada y Marroquín de la Fuente, 1992) (Figura 2B).

4.1.2.3 Flores

Blanco amarillentas, atractivas y aromáticas, dispuestas en racimos espigados, de 2 a 5 cm de largo, cilíndricas, densas, cáliz ligeramente campanulado; la corola de aproximadamente 1.2 cm de largo, mucho más grande que el cáliz, de 5 lóbulos; estambres numerosos, filamentos unidos en la base; ovarios glabrosos (Vires, 1986) (Figura 2B).

4.1.2.4 Fruto

Grueso, de paredes gruesas, leñoso, generalmente oblongo o elíptico en la sección transversal, de aproximadamente 2 cm de ancho y hasta 20 cm de largo, no o escasamente constreñidas entre las semillas que se mantienen firmemente en compartimientos casi sellados dentro de las vainas por largo tiempo, tardíamente dehiscentes, internamente septadas (Correll and Johnston, 1970). Semillas transversas en la vaina, separadas por delgados tejidos alrededor de 1.2 cm de longitud y 0.6 cm de ancho, marrón rojizas, con forma oblonga arriñonadas, de revestimiento grueso (Vires, 1986) (Figura 2C).

4.1.2.5 Tallo

Tronco color rojo oscuro a púrpura o marrón, grueso, de 60 cm de diámetro, pero usualmente de sólo 10 cm. Ramas cortas y fuertes, dispuestas en zigzag, bifurcadas,

armadas con espinas estipulares verdaderas en la base de cada hoja. La corteza de color gris pálido en las ramas más jóvenes, inicialmente lisa, pero llega a ser un poco agrietada (Correll and Johnston, 1970; Vires, 1986) (Figura 2D).

4.2 Usos e Importancia de *Ebenopsis ebano*

Por lo general su madera, debido a su dureza y durabilidad, se utiliza para obtener postes, para la fabricación de muebles y gabinetes, mangos para cuchillería fina, en construcciones marinas, armazones de casas y puentes de caminos, se utiliza también como combustibles, obteniéndose carbón de alta calidad, etc. Frecuentemente es plantado como árbol de sombra y con fines ornamentales (González, 1996).

Las semillas del ébano son consumidas por muchas comunidades de México, particularmente en el noreste del país. Las consumen cocidas cuando están verdes, y tostadas cuando están maduras, éstas últimas enteras o molidas para ser mezcladas con café o como sustituto de este (Correll and Johnston, 1970; Vires, 1986).

Recientemente se ha comprobado su actividad antimicrobiana de semillas maduras o inmaduras, crudas o cocidas, contra microorganismos de importancia clínica como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Candida albicans*, con resultados prometedores (Gómez-Flores *et al.*, 2009).

4.3 Propagación Tradicional de *Ebenopsis ebano*

El ébano se propaga por semilla, sin embargo, debido a su dureza y a la presencia de tegumentos impermeables, se requiere de procesos de escarificación, principalmente física o con el uso de ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (Alaniz and Everitt, 1978).

4.4 Embriogénesis Somática en Tribu Ingeae

Hasta la fecha la regeneración de plantas por embriogénesis somática no se ha llevado en la especie *E. ebano*, no obstante, se ha implementado en especies de la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae, tribu Ingeae, las cuales pueden servir de panorama comparativo con *E. ebano*.

Las primeras investigaciones de embriogénesis somática y regeneración fueron en la especie *Albizia richardiana* con hipocótilos juveniles como explante inicial (Tomar and Gupta, 1988); en *Albizia falcataria* con cotiledones juveniles (Sinha and Mallick, 1993); en *Albizia julibrissin* con semillas inmaduras, cotiledones y ejes embrionarios (Burns and Wetzstein, 1998); en segmentos internodales y peciolos de *Calliandra tweedii* (Kumar *et al.*, 2002; Heikrujam *et al.*, 2014) y con segmentos nodales y brotes apicales de *Albizia lebbeck* (Saeed and Shahzad, 2015).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del Estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Unidad Marín, UANL, localizado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, Marín, N. L.; y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, UANL, localizado en Av. Francisco Villa s/n, Col. Ex Hacienda “El Canadá”, Gral. Escobedo, N. L., durante el periodo enero 2016 a junio 2018.

5.2 Material Vegetal

Se utilizaron vainas inmaduras de ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes), las cuales se recolectaron de árboles adultos en fructificación, localizados en la Facultad de Agronomía, Unidad Marín, UANL. Los explantes utilizados fueron semillas inmaduras.

5.3 Desinfestación

Las vainas inmaduras se lavaron superficialmente con detergente comercial líquido (Axion®) y se enjuagaron con agua potable (Figura 3A). Posteriormente se retiraron las semillas y se colocaron en 100 mL de agua potable, 5.0 mL de Axion® y 3.0 mL de Cloralex® y se mantuvieron agitaron en tres lapsos de 10 min cada uno (Figura 3B y C). Después se colocaron en una solución fungicida, bactericida y antioxidante, a base

de 2.0 g L⁻¹ de Final Bacter[®] (sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de oxitetraciclina 6.0 %), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar[®] Gold (azoxistrobin 18 %), 400 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 400 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 2.0 mL L⁻¹ de bactericida vegetal (Microdyn[®]) y 30 g L⁻¹ de sacarosa, durante 90 min en agitación (Figura 3D). Concluido el proceso se enjuagaron con agua bidestilada.

Dentro de la campana de flujo laminar las semillas se colocaron en etanol 96° durante 60 segundos y se enjuago con agua bidestilada esterilizada, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.08, 1.62 y 2.16 % (20, 30 y 40 % v/v Cloralex[®]), más 0.02 % de Tween-20 por 10 min (Figura 3E). Finalmente, los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada, se retiró la testa y se colocaron en una solución antioxidante de PVP (polivinilpirrolidona) 400 mg L⁻¹, hasta su siembra (Figura 3F, G y H).

5.4 Preparación del Medio de Cultivo

5.4.1 Establecimiento

El medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de semillas de ébano consistió en las sales básicas MS (Murashige and Skoog, 1962), el cual se adicionó con 0.5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.1 mg L⁻¹ de tiamina, 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina, 2.0 mg L⁻¹ de glicina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol y 30 g L⁻¹ de sacarosa; además se suplementó con 9.06 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2.32 µM de kinetina. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02, utilizando KOH y HCl 1.0 N y se solidificó con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel[™]. Posteriormente se colocó en recipientes de vidrio de 150 mL, y se esterilizó en autoclave a 1.2 kg m⁻² durante 15 min. Los cultivos se incubaron en total oscuridad a 24 ± 2 °C durante cuatro semanas.

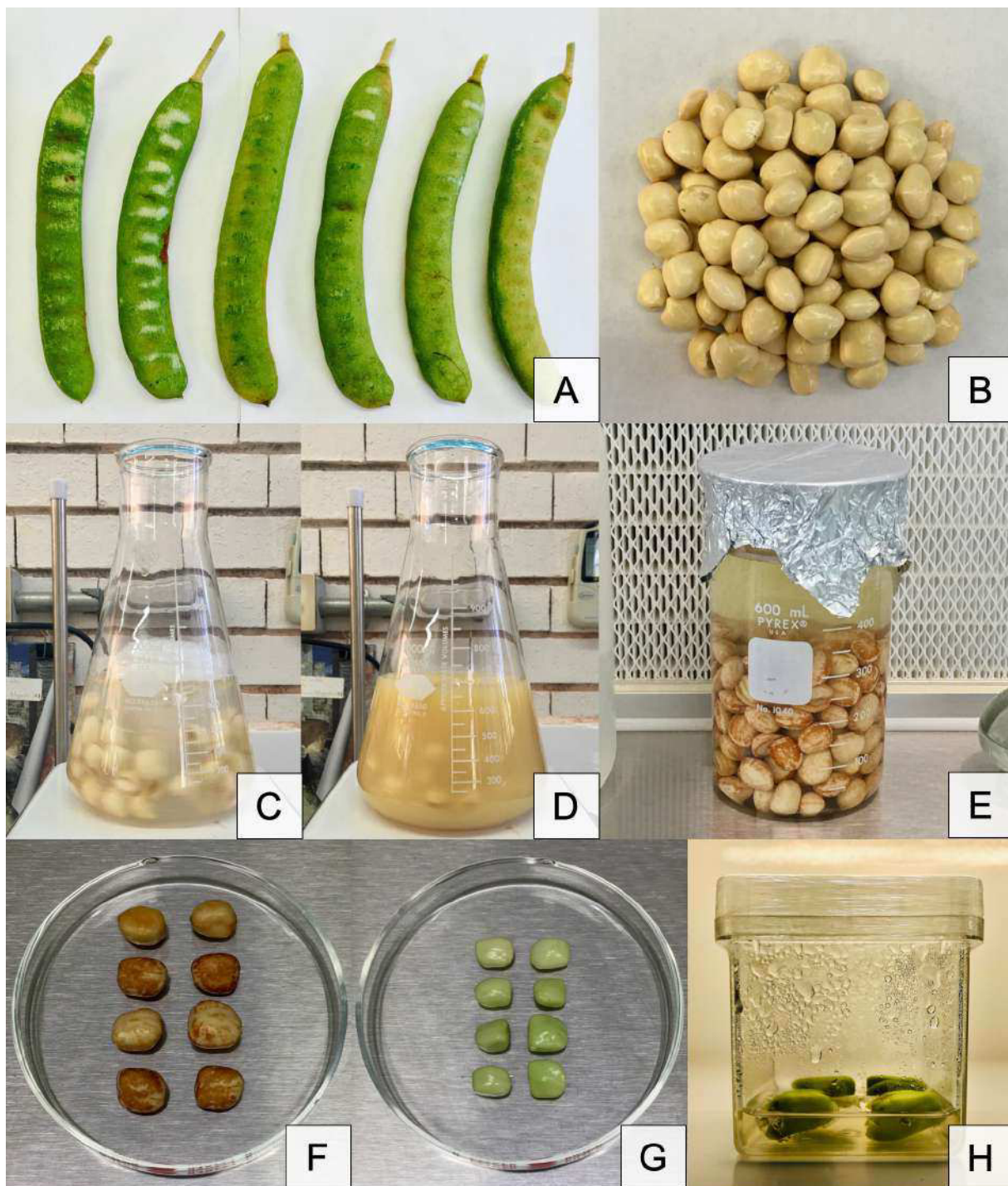


Figura 3. Proceso de desinfección de semillas de *E. ebano*. A-B) Vainas y semillas inmaduras de ébano; C) Lavado en agua potable y jabón líquido; D) Solución bactericida-fungicida; E) Inmersión en 1.62 % de NaClO y agua bidestilada; F-G) Eliminación de la testa de la semilla; H) Siembra *in vitro*.

5.4.2 Inducción de Callo Embriogénico

Se seleccionaron plántulas *in vitro* de ébano de cuatro semanas, dejando como explante los cotiledones más el eje embrionario. Los explantes fueron subcultivados a medio MS basal adicionado con los componentes descritos anteriormente y se suplementaron con las concentraciones de 2.26, 4.53, 6.79 y 9.06 μM de 2,4-D más 2.32 μM de kinetina y 10% de agua de coco (AC); además de un medio sólo con 10% AC y un control sin reguladores de crecimiento vegetal. El pH se ajustó como se describe anteriormente. Los medios de cultivo fueron líquidos y semisólidos. En los semisólidos se agregó 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™. Ambos tipos de medios se colocaron en cajas Magenta™ de 250 mL y se esterilizaron bajo las mismas condiciones mencionadas. Los cultivos semisólidos se incubaron en total oscuridad o fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C durante 8 semanas; mientras que los cultivos líquidos se colocaron en un agitador orbital a 80 rpm en condiciones de total oscuridad o fotoperiodo, bajo la misma temperatura y permanencia descrita anteriormente.

5.4.3 Proliferación de Callo Embriogénico

Después de la inducción de callo embriogénico, estos se mantuvieron en proliferación en un medio MS basal adicionado con los componentes mencionados, más 4.07 μM de 2,4-D y 2.32 μM de kinetina, durante ocho semanas con subcultivos a medio nuevo cada dos semanas, incubados en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 24 ± 2 °C (Figura 7A y B).

5.4.4 Maduración de Embriones Somáticos

Los callos embriogénicos en fase globular de la etapa de proliferación se transfirieron a un medio de pre-maduración, utilizando medio MS basal con los componentes anteriores más 1.0 g L^{-1} de carbón activado, pH de 5.7 y solidificado con 4.5 g L^{-1} de Phytigel™. Los cultivos se incubaron por dos semanas en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 7C). Concluida la etapa de pre-maduración, los callos embriogénicos se subcultivaron a los tratamientos de maduración, en medio MS basal más ácido abscísico (ABA) a 3.78, 7.57, 15.12 y $30.24 \text{ } \mu\text{M}$ o polietilenglicol 4000 (PEG) a 3 y 6 %; además de tres tratamientos en medio MS con macroelementos reducidos al 50 % y sacarosa a 3, 4 y 5 %. Como tratamiento control se utilizó medio MS basal sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó como se describe anteriormente y se solidificaron con 4.5 g L^{-1} de Phytigel™. Los medios de cultivo se esterilizaron bajo las mismas condiciones anteriores, a excepción de los tratamientos con ABA, el cual se adicionó al medio después de la esterilización, utilizando filtro Millipore (Millex®) de $0.22 \text{ } \mu\text{m}$. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante ocho semanas.

5.4.5 Germinación de Embriones Somáticos

Embriones somáticos en fase torpedo y cotiledonar de cuatro y ocho semanas de maduración, se transfirieron a los tratamientos de germinación utilizado medio MS basal reducido al 50 %, y suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) a 2.22 y $4.44 \text{ } \mu\text{M}$ y ácido giberélico (AG_3) a 1.45 y $2.89 \text{ } \mu\text{M}$, así como la combinación de 2.22/1.45 μM BAP/ AG_3 , todos combinados con $2.68 \text{ } \mu\text{M}$ de ácido 1-naftalenacético (ANA). Como

tratamiento control se utilizó medio MS al 50 % sin reguladores. El pH se ajustó a 5.7 y se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™. Los medios de cultivo se esterilizaron bajo las condiciones antes mencionadas, a excepción de los tratamientos con AG₃, el cual se agregó al medio después de la esterilización, utilizando filtro Millipore. Los cultivos se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 24 ± 2 °C durante cuatro semanas.

5.5 Contenido de Humedad en Embriones Somáticos

De cada tratamiento de maduración probado, se tomo el peso fresco y seco (g) y el contenido de humedad (%). Los callos frescos fueron secados a 60 °C en un horno de calentamiento, hasta obtener peso constante. Ambos pesos se pesaron en una balanza analítica Adventurer™ (Ohaus®). El contenido de humedad se expresó como el porcentaje sobre la base del peso fresco y se calculo de la siguiente manera:

$$\frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$
 (Pérez *et al.*, 2015). Se utilizaron ocho repeticiones por

tratamiento.

5.6 Histología

Para la caracterización estructural, fueron seleccionados los callos embriogénicos de los tratamientos más representativos de la etapa de maduración, después de seis semanas de iniciar la etapa. Se emplearon muestras de 0.5 cm³ que se fijaron en una solución FAA (10 % formaldehído, 50 % etanol, 5 % ácido acético glacial, 35 % agua bidestilada) (Jensen, 1962), a 4°C por 24 h. Posteriormente se deshidrataron en series crecientes de alcohol isopropílico [50, 70, 80, 90, y 2 × 100 % (v/v)] y xileno [50 %

alcohol isopropílico – 50 % xileno, y 2 × xileno puro], luego embebidas en parafina (2 ×). En seguida, las muestras fueron orientadas y se montaron en parafina. Los cortes se realizaron en posición anterior y posterior a 4 µm de grosor en un micrótopo automático (Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific, USA).

Los cortes fueron luego desparafinados en xileno (100%), etanol-xileno (50-50) y series de alcoholes (etanol 100 % y etanol 96°), para después teñirse con O-safranina (1.0 %) y cristal violeta (1.0 %), seguido de series de alcoholes (etanol 96° × 2 y etanol 100 %), etanol-xileno (50-50) y xileno (100 % × 2). Finalmente, las muestras fueron montadas en resina sintética y se observaron un microscopio Labomed CxL (Labo America Inc., USA).

5.7 Diseño Experimental

En la etapa de establecimiento de semillas de ébano, se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos de desinfestación y 10 repeticiones. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, oscurecimiento y callogénesis a 28 días después de la siembra.

Para la inducción de callo, el experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 6x2x2, siendo el factor A las concentraciones de 2,4-D y AC, el factor B el tipo de medio y el factor C las condiciones de incubación, dando un total de 24 tratamientos con seis repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de callo embriogénico a ocho semanas del subcultivo.

La etapa de maduración de embriones somáticos se estableció también en un diseño completamente al azar con 10 tratamientos e igual número de repeticiones. Las

variables que se evaluaron fueron: número de embriones somáticos totales en diferentes fases y la frecuencia de maduración que se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{número de embriones cotiledonares} \times 100}{\text{número de embriones totales}}$$
, a cuatro y ocho semanas después de la

transferencia.

Mientras que, en la etapa de germinación fue utilizado un diseño completamente al azar con seis tratamientos y seis repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de germinación a cuatro semanas del subcultivo en embriones somáticos de cuatro y ocho semanas de maduración.

Para todas las etapas, la unidad experimental fue un frasco de vidrio o una caja Magenta™. En el establecimiento e inducción se colocaron cuatro semillas o explantes, mientras que en la maduración se colocaron cuatro masas embriogénicas de aproximadamente 200 mg. En la etapa de germinación se colocaron de dos a cuatro embriones somáticos maduros por repetición.

Los porcentajes de contaminación, oscurecimiento, inducción de callo y germinación se transformaron mediante *Arcoseno*.

Para evaluar los efectos principales, así como su interacción en la inducción de callo embriogénico, se utilizó un modelo lineal general univariado y posteriormente se realizó un análisis de varianza de un factor para evaluar todos los tratamientos. Además, se realizó un análisis de varianza para la etapa de establecimiento, maduración, germinación y las mediciones de peso fresco y seco y contenido de humedad. La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey $p \leq 0.05$ y los resultados se analizaron mediante el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento

Las concentraciones de NaClO utilizada en el proceso de desinfección de semillas inmaduras de *E. ebano*, resultaron efectivas en el establecimiento *in vitro* (Figura 4). La contaminación por bacterias fue la más común, sin embargo, está no rebasó el 30 % en el tiempo evaluado (Cuadro 1). En el caso del oscurecimiento la menor incidencia fue con 1.08 % NaClO (Figura 4A), sin embargo, esta concentración fue la que mayor contaminación presentó (Cuadro 1). Finalmente, en los porcentajes de callogénesis no se presentó diferencia significativa (sig. $p \leq 0.05$) entre las concentraciones utilizadas, incidiendo un 10 % en promedio (Cuadro 1). En todas las unidades experimentales, la germinación de las semillas fue evidente, con desarrollo de radícula, hipocótilo y epicótilo.

Cuadro 1. Efecto de las concentraciones de NaClO en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de *E. ebano*, en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.

% NaClO	% Contaminación	% Oscurecimiento	% Callogénesis
1.08	27.5 ± 7.0 a	5.33 ± 3.7 b	10.0 ± 4.4 a
1.62	9.22 ± 3.9 ab	12.5 ± 4.5 ab	12.3 ± 5.9 a
2.16	6.51 ± 4.4 b	25.6 ± 5.8 a	9.16 ± 4.0 a

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

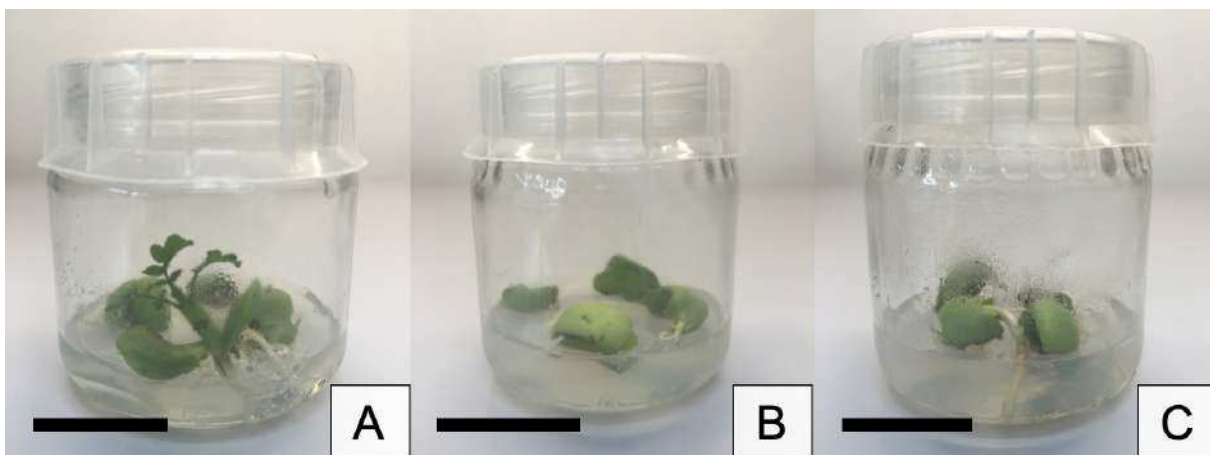


Figura 4. Efecto de las concentraciones de NaClO en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *E. ebano*. A) 1.08 % NaClO; B) 1.62 % NaClO; C) 2.16 % NaClO. Barras: 2.0 cm en A-C.

6.2 Inducción de Callo Embriónico

Se observó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en los tres niveles individuales evaluados (Cuadro 2), así como en la interacción de la concentración de 2,4-D/AC por tipo de medio (Cuadro 3). En lo referente a las concentraciones de 2,4-D más AC, el tratamiento con mayor concentración (9.06 μM) fue el que presentó la mayor generación de callo embriónico, sin embargo, valores muy cercanos se mostraron en el tratamiento control sin reguladores (Cuadro 2A; Figura 5A y B). El resto de las concentraciones varió entre 30 y 50 % de inducción (Cuadro 2A; Figura 5). Las auxinas, generalmente 2,4-D, se requieren para la inducción de callo (Rai *et al.*, 2007), aunque su efecto puede potenciarse en combinación con una baja cantidad de citocinina, como BAP, TDZ o kinetina al igual que lo realizado en la presente investigación (Xie and Hong, 2001; Vengadesan *et al.*, 2002; Rathore *et al.*, 2012). Contrario a esto, en *Calliandra tweedii*, la proliferación de callo embriónico fue mayor con citocininas, como 2-isopentiladenina (2iP) y BAP (Heikrujam *et al.*, 2014).

Asimismo, en *Albizia lebbbeck* la inducción de callo fue con BAP, kinetina o TDZ (Saeed and Shahzad, 2015). No obstante, para ambas especies los tratamientos sin reguladores no permitieron la formación de callo embriogénico en los explantes, contrario a lo ocurrido en esta investigación.

En relación con el tipo de medio, los semisólidos presentaron mayor formación de callo embriogénico ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2B), presentando callos nodulares, de superficie suave y sin presencia de oscurecimiento (Figura 5C, D y E). Los medios líquidos tuvieron valores muy cercanos a los semisólidos, generando embriones somáticos que se separaron del tejido principal (Figura 5A, B, y F). Está evidenciado que las tasas de proliferación de callo embriogénico son mayores en medios líquidos (von Arnold *et al.*, 2002), ya que la agitación constante de los medios líquidos rompe la conexión entre el tejido principal y libera embriones individuales y pequeños agregados, que luego continúan proliferando (Egertsdotter, 1998). Dentro de la familia Fabaceae, algunas investigaciones que han utilizado medios líquidos con éxito para la inducción de callo embriogénico fueron en *Acacia farnesiana* y *A. schaffneri* (Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000) y *A. sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002). Cabe señalar que, en ambos tipos de medios, en la etapa de proliferación, se produjo oscurecimiento en los explantes, así como vitrificación en los medios líquidos.

En cuanto a las condiciones de luz utilizadas, los explantes se favorecieron en condiciones de total oscuridad ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2C; Figura 5A y F). Los callos embriogénicos generados en estas condiciones presentaron tonalidades crema y amarillo claro, mientras que, en fotoperiodo los callos fueron de color verde claro. Aunque la luz es invariablemente esencial para el crecimiento de plántulas, algunos cultivos de células y tejidos no organizados pueden crecer en su ausencia, y la

oscuridad puede ser beneficiosa (George *et al.*, 2008). El efecto de factores físicos como la luz en el proceso de embriogénesis somática, se ha desarrollado exitosamente en especies como *Arabidopsis thaliana* (Gaj, 2002), *Cinnamomum camphora* (Shi *et al.*, 2009) y *Cyathea delgadii* (Mikula *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Efecto individual de la concentración de 2,4-D y AC (A), tipo de medio de cultivo (B) y condiciones de incubación (C), en la inducción de callo embriogénico en explantes de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

(A) Concentración		% Callo embriogénico
2,4-D μM	% AC [‡]	
0.0	0	61.8 \pm 6.8 ab
0.0	10	49.0 \pm 6.8 ab
2.26	10	40.0 \pm 6.8 ab
4.53	10	52.7 \pm 6.8 ab
6.79	10	39.0 \pm 6.8 b
9.06	10	65.1 \pm 6.8 a
(B) Tipo de medio		
Semisólido		57.3 \pm 3.9 a
Líquido		45.2 \pm 3.9 b
(C) Condición		
Fotoperiodo		44.5 \pm 3.9 b
Oscuridad		58.0 \pm 3.9 a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Agua de coco. [§]Medias más error estándar.

Por otra parte, se presentó diferencia significativa entre las concentraciones de 2,4-D/AC y tipo de medio, independientemente de la condición de luz ($p \leq 0.05$) (Cuadro 3). En esta interacción la dosis de 9.06 μM de 2,4-D en medio líquido permitió la mayor generación de callo embriogénico en explantes de *E. ebano*. Mientras que se

obtuvieron valores cercanos con concentraciones de 2.26 y 4.53 μM de 2,4-D/AC y el control absoluto (Figura 5B, C y D).

Cuadro 3. Efecto de la interacción de la concentración de 2,4-D y tipo de medio de cultivo, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

Concentración 2,4-D μM	Tipo de medio	% Callo embriogénico
0.0	Semisólido	61.0 \pm 5.1 abc
	Líquido	62.5 \pm 12.5 ab
0.0 [‡]	Semisólido	56.2 \pm 9.5 abc
	Líquido	41.7 \pm 12.0 abc
2.26	Semisólido	63.2 \pm 10.7 ab
	Líquido	16.7 \pm 11.2 c
4.53	Semisólido	65.3 \pm 8.1 ab
	Líquido	40.3 \pm 13.5 abc
6.79	Semisólido	45.9 \pm 7.0 abc
	Líquido	31.9 \pm 6.9 bc
9.06	Semisólido	52.1 \pm 4.8 abc
	Líquido	78.0 \pm 8.4 a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio con 10 % AC y sin reguladores. [§]Medias más error estándar.

Finalmente, la dosis más alta de 2,4-D (9.06 μM), en medio líquido y condiciones de oscuridad, permitió la mayor generación de callo embriogénico ($p \leq 0.05$) (Cuadro 4; Figura 5A). Valores muy similares se presentaron con 2.26 y 4.53 μM de 2,4-D en medios semisólidos bajo condiciones de oscuridad (Cuadro 4). Cabe mencionar, que la formación del callo embriogénico en todos los tratamientos, inicio en el embrión cigótico inmaduro y posteriormente se desplazó hacia los cotiledones (Figura 5), y en

algunos casos fue evidente la generación de embriogénesis somática secundaria y el desarrollo de estructuras corazón y cotiledonares (Figura 6A-C).

Cuadro 4. Efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

Tratamiento	2,4-D μM	% AC [‡]	Medio	Condición	% CE [§]	
1	0.0	0	Semisólido	Fotoperiodo	55.4 \pm 5.5	ab
2	0.0	10	Semisólido	Fotoperiodo	61.1 \pm 10.5	ab
3	2.26	10	Semisólido	Fotoperiodo	47.2 \pm 11.5	ab
4	4.53	10	Semisólido	Fotoperiodo	54.1 \pm 10.0	ab
5	6.79	10	Semisólido	Fotoperiodo	39.1 \pm 6.9	ab
6	9.06	10	Semisólido	Fotoperiodo	43.3 \pm 6.1	ab
7	0.0	0	Semisólido	Oscuridad	66.6 \pm 8.6	ab
8	0.0	10	Semisólido	Oscuridad	51.4 \pm 16.7	ab
9	2.26	10	Semisólido	Oscuridad	79.1 \pm 16.3	ab
10	4.53	10	Semisólido	Oscuridad	76.4 \pm 11.9	ab
11	6.79	10	Semisólido	Oscuridad	52.7 \pm 12.3	ab
12	9.06	10	Semisólido	Oscuridad	61.0 \pm 5.5	ab
13	0.0	0	Líquido	Fotoperiodo	58.3 \pm 15.4	ab
14	0.0	10	Líquido	Fotoperiodo	25.0 \pm 17.0	ab
15	2.26	10	Líquido	Fotoperiodo	16.6 \pm 16.7	b
16	4.53	10	Líquido	Fotoperiodo	30.5 \pm 16.3	ab
17	6.79	10	Líquido	Fotoperiodo	33.3 \pm 10.5	ab
18	9.06	10	Líquido	Fotoperiodo	70.0 \pm 14.1	ab
19	0.0	0	Líquido	Oscuridad	66.6 \pm 21.1	ab
20	0.0	10	Líquido	Oscuridad	58.3 \pm 15.4	ab
21	2.26	10	Líquido	Oscuridad	16.6 \pm 16.7	b
22	4.53	10	Líquido	Oscuridad	50.0 \pm 22.4	ab
23	6.79	10	Líquido	Oscuridad	30.5 \pm 10.0	ab
24	9.06	10	Líquido	Oscuridad	86.1 \pm 9.1	a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Agua de coco. [§]Callo embriogénico. [¶]Medias más error estándar.

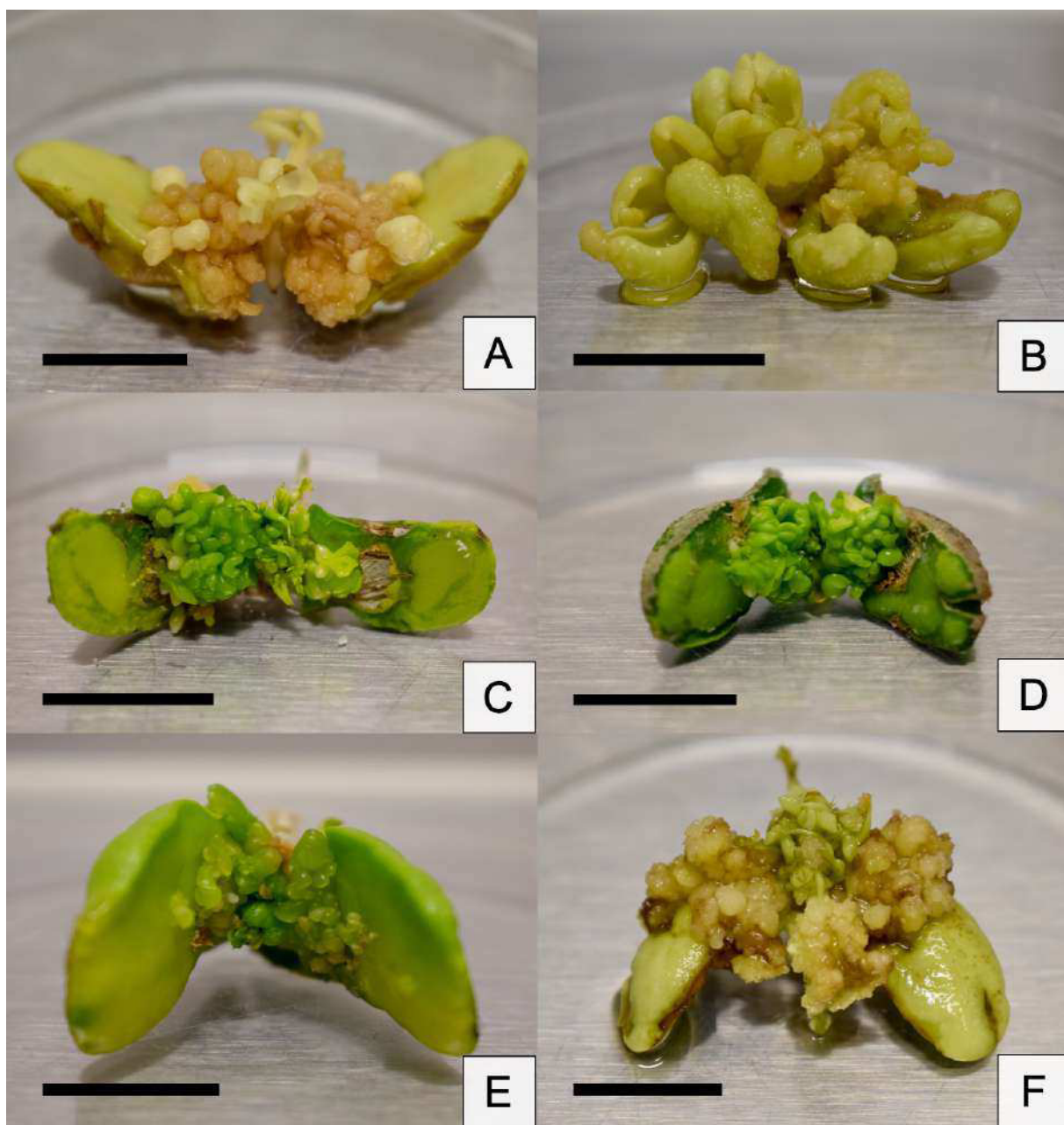


Figura 5. Inducción de callo embriogénico en *E. ebano*. A) $9.06 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio líquido y oscuridad; B) Medio líquido sin reguladores y fotoperiodo; C) $2.26 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio semisólido y fotoperiodo; D) $4.53 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio semisólido y fotoperiodo; E) $6.79 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio semisólido y fotoperiodo; F) Medio líquido con 10 % AC y oscuridad, sin reguladores. Barras: 1.0 cm en A-F.

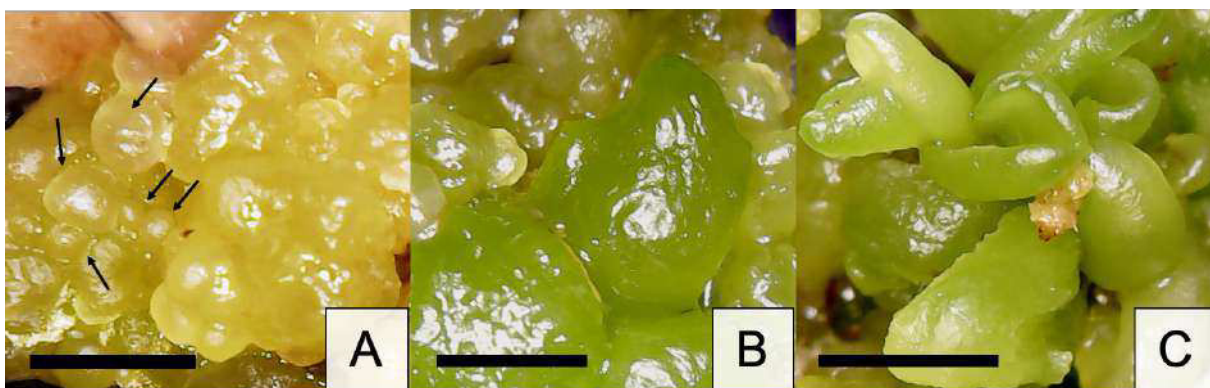


Figura 6. Efecto de los tratamientos de inducción en explantes de *E. ebano*. A) Embriones globulares secundarios en 9.06 μM 2,4-D, en medio líquido y oscuridad; B) Embriones corazón en 4.53 μM 2,4-D, en medio semisólido y fotoperiodo; C) Embriones cotiledonares en medio sin reguladores, en medio semisólido y fotoperiodo. Barras: 3 mm en A-C.

6.3 Maduración de Embriones Somáticos

En los tratamientos probados para la maduración de embriones somáticos, se obtuvieron respuestas diferentes de acuerdo con el suplemento utilizado en el medio de cultivo. En todos los tratamientos la embriogénesis somática secundaria estuvo presente, donde las masas globulares que se subcultivaron a los tratamientos comenzaron nuevamente a formar embriones. En todos los casos los embriones en diferentes fases presentaron coloración verde claro y amarillo y por lo general, se organizaron en grupos. Cabe destacar que la maduración en todos los tratamientos fue de manera asíncrona, presentado las diferentes fases embrionarias en los grupos (Figuras 8-12).

En la primera evaluación, la presencia de sacarosa en los tratamientos de maduración a concentraciones de 4 y 5 %, permitieron el mayor número de embriones en sus diferentes fases (Figura 11), aunque valores cercanos se presentaron en el tratamiento control y con 3 y 6 % de PEG (sig. $p \leq 0.05$) (Cuadro 5; Figuras 8A-B y 12A-D). Sin

embargo, el mayor número de embriones de fase cotiledonar se presentaron en los tratamientos con 4 % de sacarosa y 3 % de PEG (Cuadro 5). Mientras que la frecuencia de maduración fue evidente con 6 % de PEG (Cuadro 5; Figura 12C y D). En cambio, a las ocho semanas de maduración, ambas concentraciones de PEG y 4 % de sacarosa permitieron el mayor desarrollo de embriones totales. Sin embargo, el número de embriones cotiledonares fue superior con 3 % de PEG; y la frecuencia de maduración sucedió con 6 % de PEG (Cuadro 6). La fuente de carbono desempeña un papel vital en la síntesis de componentes celulares, proporciona energía para el crecimiento (Baque *et al.*, 2012) y regula la presión osmótica (Song *et al.*, 2018), permitiendo la formación de embriones somáticos (Rajesh *et al.*, 2014). Resultados similares se presentaron en *Psidium guajava* (Rai *et al.*, 2008), *Podophyllum hexandrum* (Rajesh *et al.*, 2014) y *Albizia lebbek* (Saeed y Shahzad, 2015). Por su parte, el PEG ha sido considerado como promotor de maduración en embriones somáticos de diferentes especies forestales, ya que actúa como un agente osmótico en los cultivos embriogénicos (Shoji *et al.*, 2006). Entre las especies que el PEG ha inducido la maduración de embriones somáticos destacan, *Psidium guajava* (Rai *et al.*, 2009), *Prosopis laevigata* (Buendía-González *et al.*, 2012) y *Juglans regia* (Jalali *et al.*, 2017). Por último, el uso de ABA en la maduración de *E. ebano* tuvo menor efecto respecto a los demás tratamientos, donde la concentración de 3.78 μM permitió solamente el 4.97 % de frecuencia de maduración (Cuadro 5; Figura 8C y D). Durante el segundo mes de evaluación, nuevamente la concentración de 3.78 μM de ABA permitió mayor generación de embriones totales y cotiledonares, pero solamente comparado con el resto de las concentraciones de este regulador (Cuadro 6). No obstante, la frecuencia de maduración fue similar en las concentraciones de 3.78 y

30.24 μM ABA (Cuadro 6; Figura 10A y B). Las concentraciones de 7.57 y 15.12 μM de ABA no presentaron los mejores valores en la maduración de embriones somáticos de *E. ebano* (Cuadro 6; Figura 9). El ABA desempeña un papel activo en la promoción de competencia embriogénica, mejorando la maduración de los embriones somáticos y calidad de estos, mediante el aumento de la tolerancia a desecación e inhibición de germinación precoz (You *et al.*, 2011). No obstante, algunas especies fabáceas han tenido resultados satisfactorios con el uso de ABA en la maduración destacando *A. farnesiana* y *A. schaffneri* (Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000) y *Calliandra tweedii* (Heikrujam *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *E. ebano*, a cuatro semanas del subcultivo.

Tratamiento	Número de embriones somáticos		Frecuencia de maduración (%)
	Embriones totales	Embriones cotiledonares	
Control	9.5 \pm 1.1 ab	0.4 \pm 0.2 ab	2.3 \pm 0.9 bc
3.78 μM ABA	8.6 \pm 1.3 abc	0.7 \pm 0.3 ab	4.9 \pm 1.7 bc
7.57 μM ABA	2.9 \pm 0.7 d	0.2 \pm 0.1 b	2.7 \pm 2.6 bc
15.12 μM ABA	3.7 \pm 0.8 cd	0.0 \pm 0.0 b	0.0 \pm 0.0 c
30.24 μM ABA	5.5 \pm 1.1 bcd	0.4 \pm 0.2 ab	4.1 \pm 1.9 bc
3 % Sacarosa [‡]	7.9 \pm 0.8 abcd	0.6 \pm 0.2 ab	10.8 \pm 3.9 abc
4 % Sacarosa [‡]	13.1 \pm 1.4 a	1.3 \pm 0.3 a	16.0 \pm 4.9 ab
5 % Sacarosa [‡]	11.6 \pm 2.0 a	0.4 \pm 0.1 ab	3.4 \pm 1.7 bc
3 % PEG	10.7 \pm 1.3 ab	1.1 \pm 0.3 a	11.9 \pm 3.9 abc
6 % PEG	11.1 \pm 1.5 ab	0.8 \pm 0.2 ab	19.6 \pm 1.0 a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % de macroelementos. [§]Medias más error estándar.

Cuadro 6. Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

Tratamiento	Número de embriones somáticos		Frecuencia de maduración (%)
	Embriones totales	Embriones cotiledonares	
Control	25.8 ± 3.2 abc	1.2 ± 0.3 bc	2.9 ± 0.7 b
3.78 µM ABA	29.3 ± 4.1 ab	1.7 ± 0.5 abc	3.4 ± 0.9 b
7.57 µM ABA	7.1 ± 1.8 d	0.3 ± 0.2 c	0.9 ± 0.6 b
15.12 µM ABA	11.0 ± 2.5 cd	0.2 ± 0.1 c	0.3 ± 0.2 b
30.24 µM ABA	16.5 ± 3.7 bcd	0.8 ± 0.2 c	3.1 ± 1.7 b
3 % Sacarosa [‡]	24.7 ± 2.0 abc	0.6 ± 0.2 c	2.4 ± 0.8 b
4 % Sacarosa [‡]	37.9 ± 3.7 a	1.7 ± 0.4 abc	9.2 ± 3.5 ab
5 % Sacarosa [‡]	27.3 ± 5.3 abc	0.9 ± 0.2 c	2.7 ± 0.9 b
3 % PEG	33.8 ± 4.2 a	2.9 ± 0.6 a	8.3 ± 2.6 ab
6 % PEG	36.4 ± 5.4 a	2.6 ± 0.4 ab	15.1 ± 4.5 a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % de macroelementos. [§]Medias más error estándar.

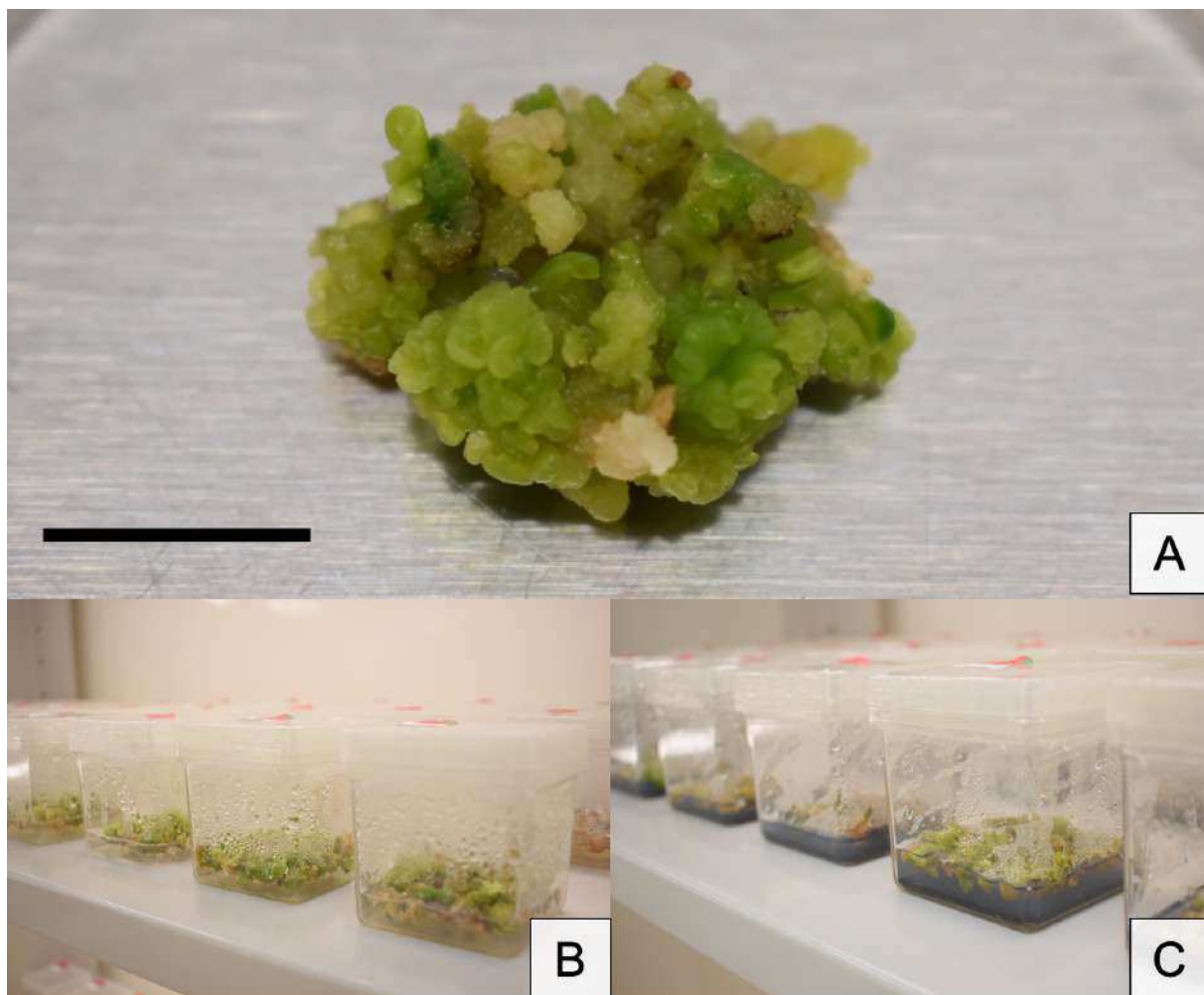


Figura 7. Etapas de proliferación y pre-maduración de embriones somáticos de *E. ebano*. A-B) Callos embriogénicos en medio de proliferación en fotoperiodo; C) Callos embriogénicos en medio de pre-maduración en fotoperiodo. Barra: 2.0 cm.

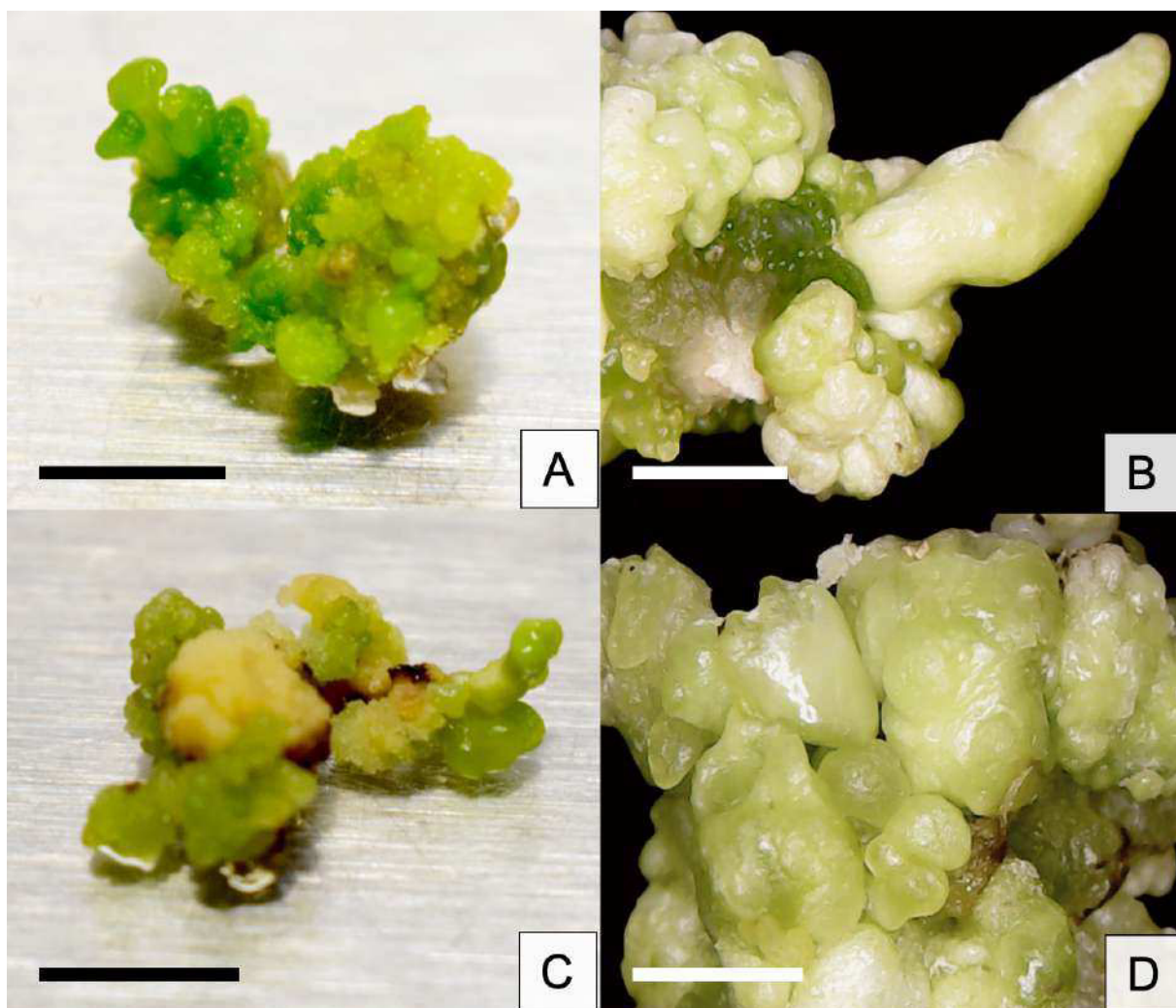


Figura 8. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *E. ebano*. A-B) Embriones globulares y torpedo en medio sin reguladores; C-D) Embriones globulares y corazón en 3.78 μM de ABA. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

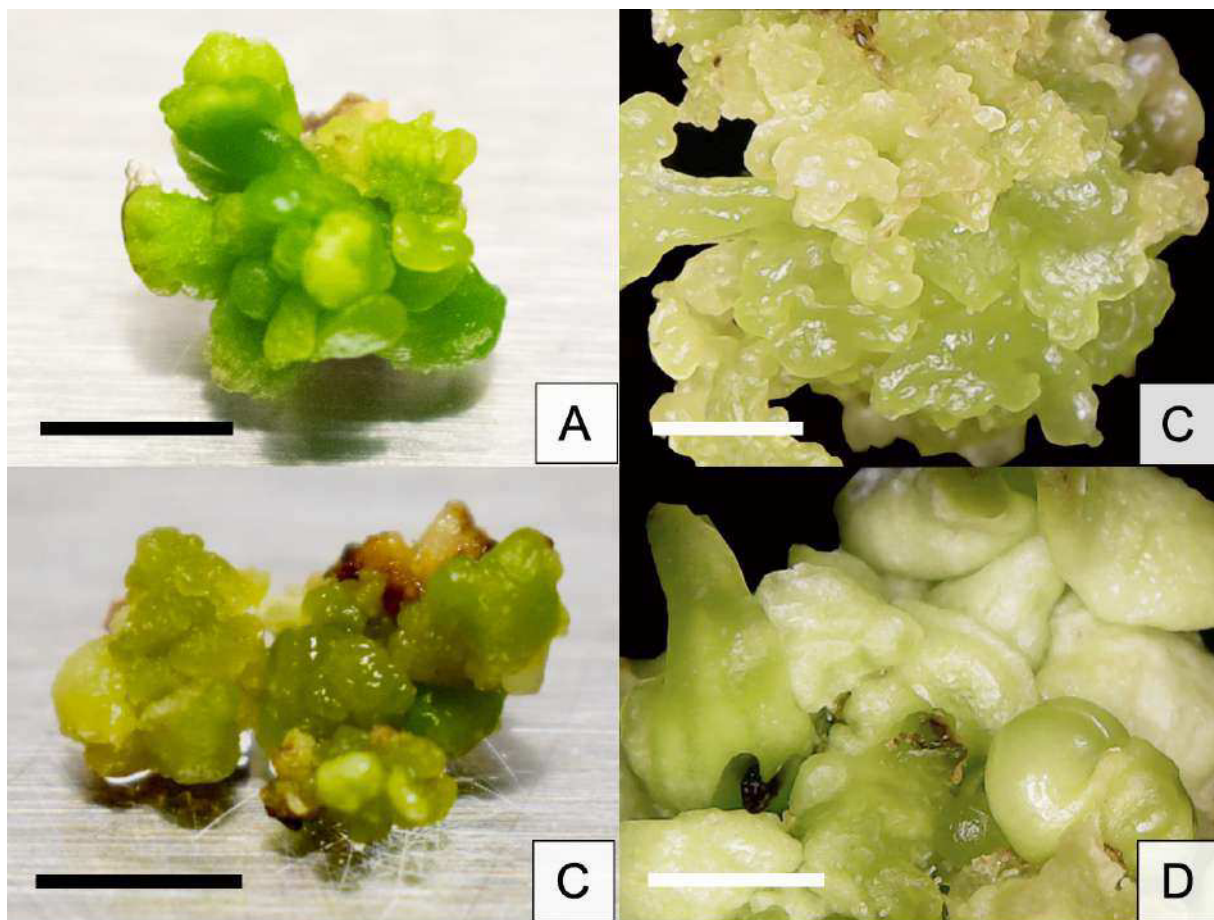


Figura 9. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *E. ebano*. A-B) Embriones corazón y torpedo en 7.57 μM de ABA; C-D) Embriones globulares, corazón y torpedo en 15.12 μM de ABA. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

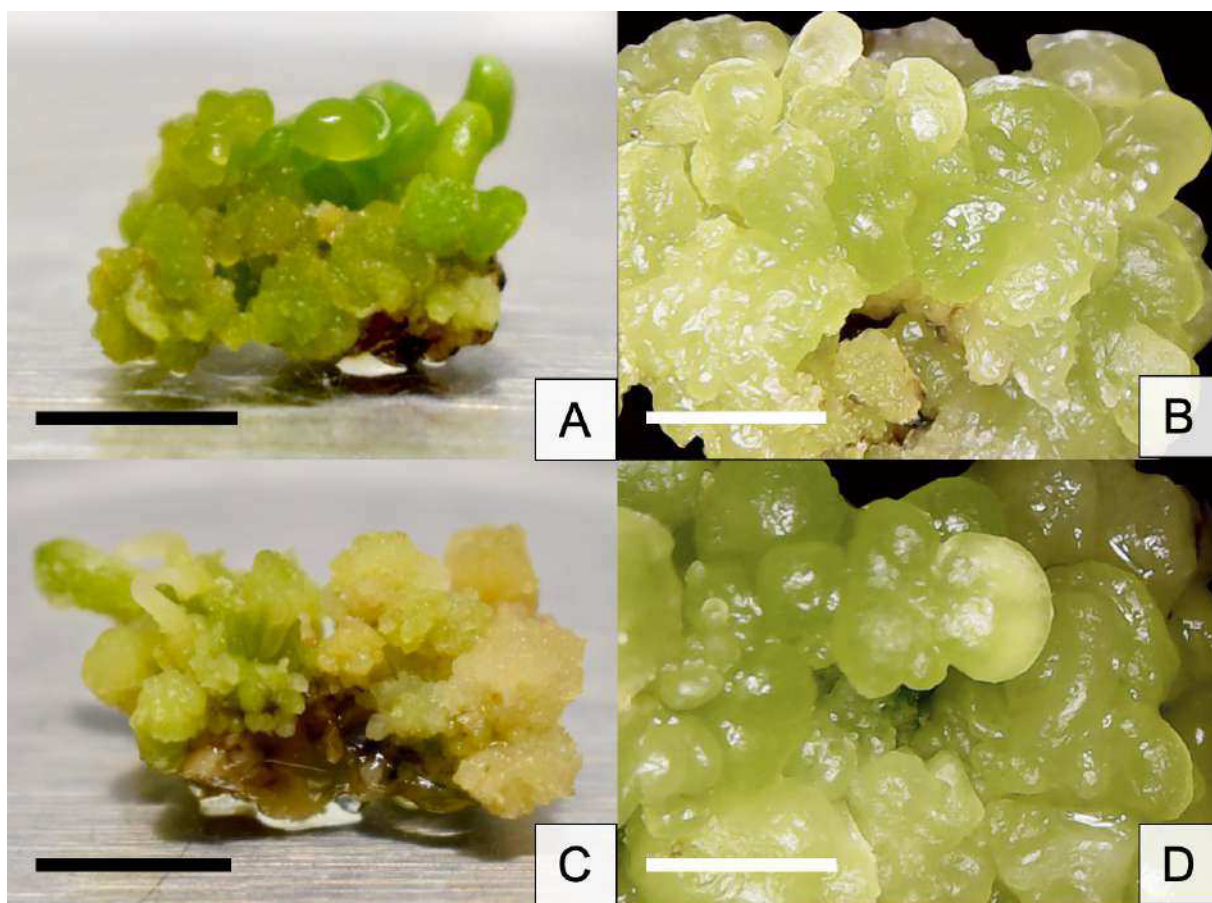


Figura 10. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *E. ebano*. A-B) Embriones globulares, corazón y torpedo en 30.24 μM de ABA; C-D) Embriones globulares y corazón con 3 % de sacarosa. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

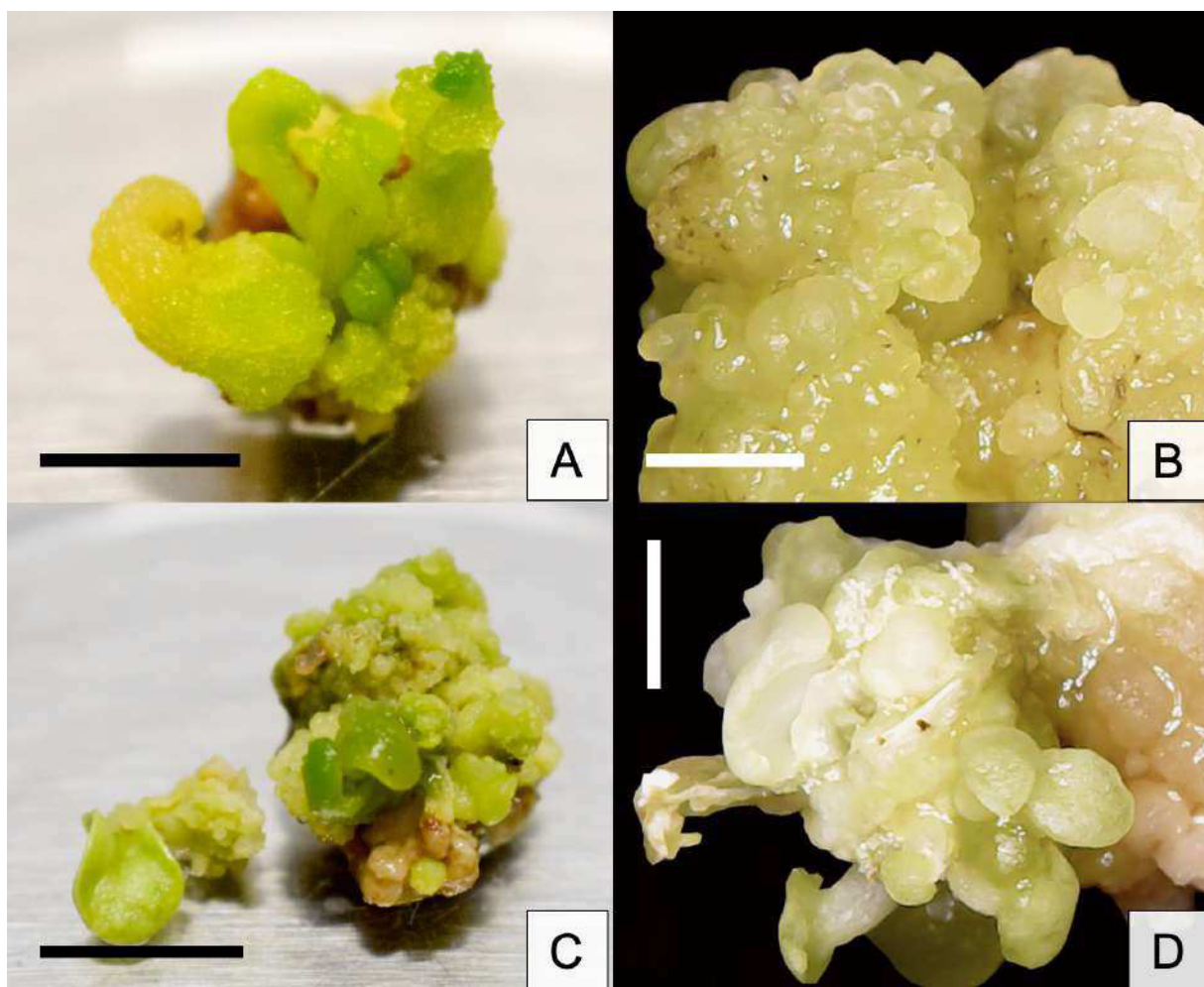


Figura 11. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *E. ebano*. A-B) Embriones globulares y torpedo con 4 % de sacarosa; C-D) Embriones globulares, corazón, torpedo y cotiledonares con 5 % de sacarosa. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

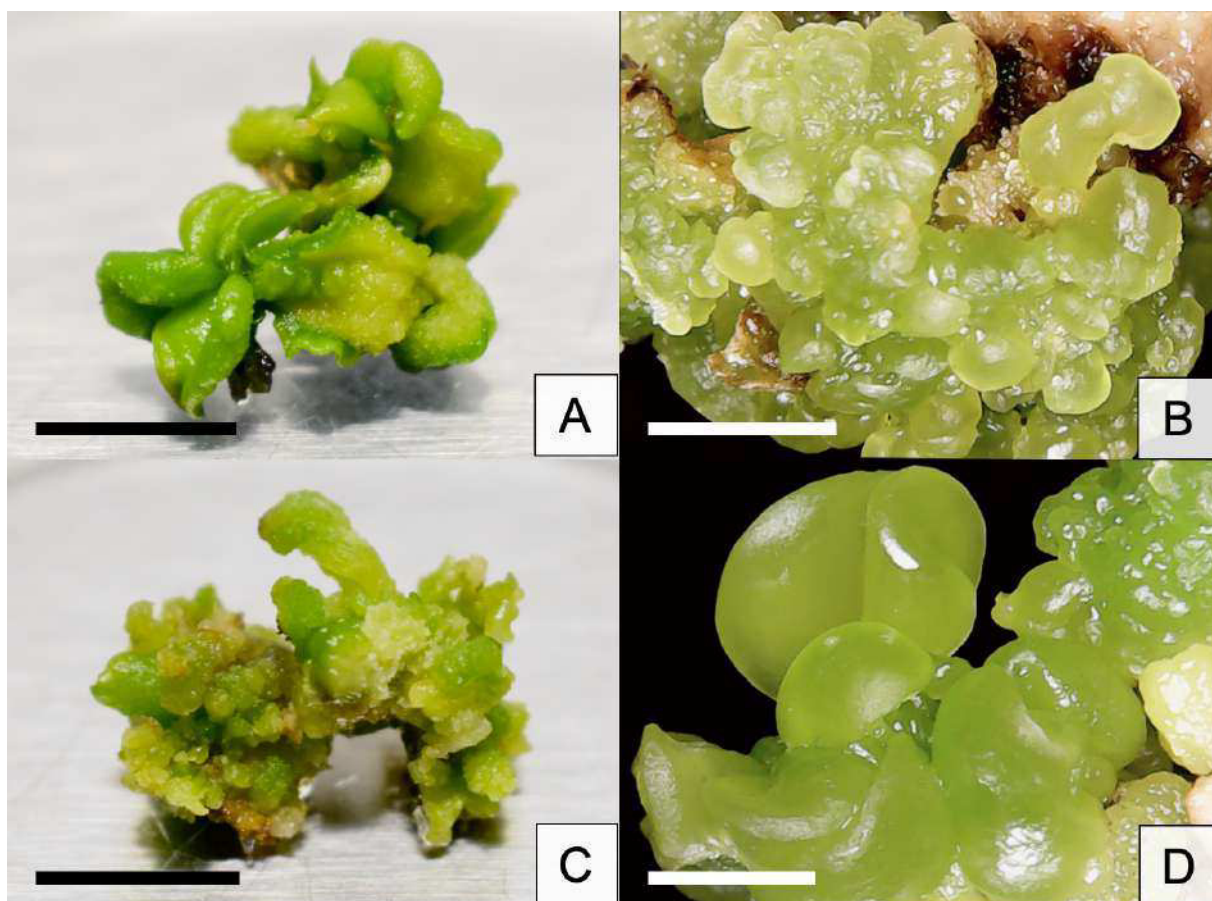


Figura 12. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *E. ebano*. A-B) Embriones globulares, corazón y cotiledonares con 3 % de PEG; C-D) Embriones torpeda y cotiledonares con 6 % de PEG. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

6.4 Contenido de Humedad en Embriones Somáticos

Los tratamientos control y con 4 % de sacarosa, presentaron los mayores valores de peso fresco en callos embriogénicos de *E. ebano* después de seis semanas en maduración; mientras que los tratamientos de 7.57 a 30.24 μM ABA presentaron el menor contenido de peso fresco (sig. $p \leq 0.05$) (Cuadro 7). En cuanto al peso seco, el tratamiento suplementado con 6 % de PEG presento los mayores valores, con una perdida del 88.1 % (Cuadro 7). El contenido de humedad fue mayor con 3.78 μM de ABA; en tanto que, los tratamientos con PEG presentaron los menores porcentajes

(Cuadro 7). Durante la maduración de la semilla, la acumulación de reservas de almacenamiento que desplazan agua se manifiesta con el aumento de peso seco y la disminución del contenido de humedad. Por tanto, estas mediciones pueden utilizarse como parámetros para determinar la etapa fisiológica de semillas, así como caracterizar el desarrollo de embriones (Prewein *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de que bajas concentraciones de sacarosa son propicias para la sincronización del desarrollo embriogénico, no es favorable para generar embriones somáticos de alta calidad; asimismo, niveles altos de sacarosa provocan la separación de la pared celular, provocando la muerte de las células embriogénicas (Zhang *et al.*, 2014). Por esta razón, se demuestra que el uso de PEG favorece la maduración de los embriones somáticos de *E. ebano*, ya que a medida que disminuye el contenido de humedad, el peso seco aumenta (Figura 13).

Cuadro 7. Variación en el contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de la etapa de maduración de *E. ebano*.

Tratamiento	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Humedad (%)
Control	1.89 ± 0.2 a	0.14 ± 0.01 ab	92.1 ± 0.5 ab
3.78 µM ABA	1.55 ± 0.1 ab	0.11 ± 0.01 abc	92.4 ± 0.4 a
7.57 µM ABA	0.85 ± 0.1 bc	0.08 ± 0.01 bc	89.6 ± 0.7 bc
15.12 µM ABA	0.86 ± 0.2 bc	0.08 ± 0.02 bc	90.4 ± 0.4 abc
30.24 µM ABA	0.45 ± 0.06 c	0.04 ± 0.01 c	89.1 ± 0.7 cd
3% Sacarosa [†]	1.45 ± 0.2 ab	0.11 ± 0.01 abc	91.7 ± 0.3 ab
4% Sacarosa [†]	1.86 ± 0.2 a	0.14 ± 0.01 ab	91.9 ± 0.8 ab
5% Sacarosa [†]	1.61 ± 0.3 ab	0.15 ± 0.02 ab	90.1 ± 0.3 abc
3% PEG	1.26 ± 0.2 abc	0.15 ± 0.02 ab	87.8 ± 0.7 cd
6% PEG	1.25 ± 0.04 abc	0.16 ± 0.01 a	86.4 ± 0.6 d

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % de macroelementos. [§]Medias más error estándar.

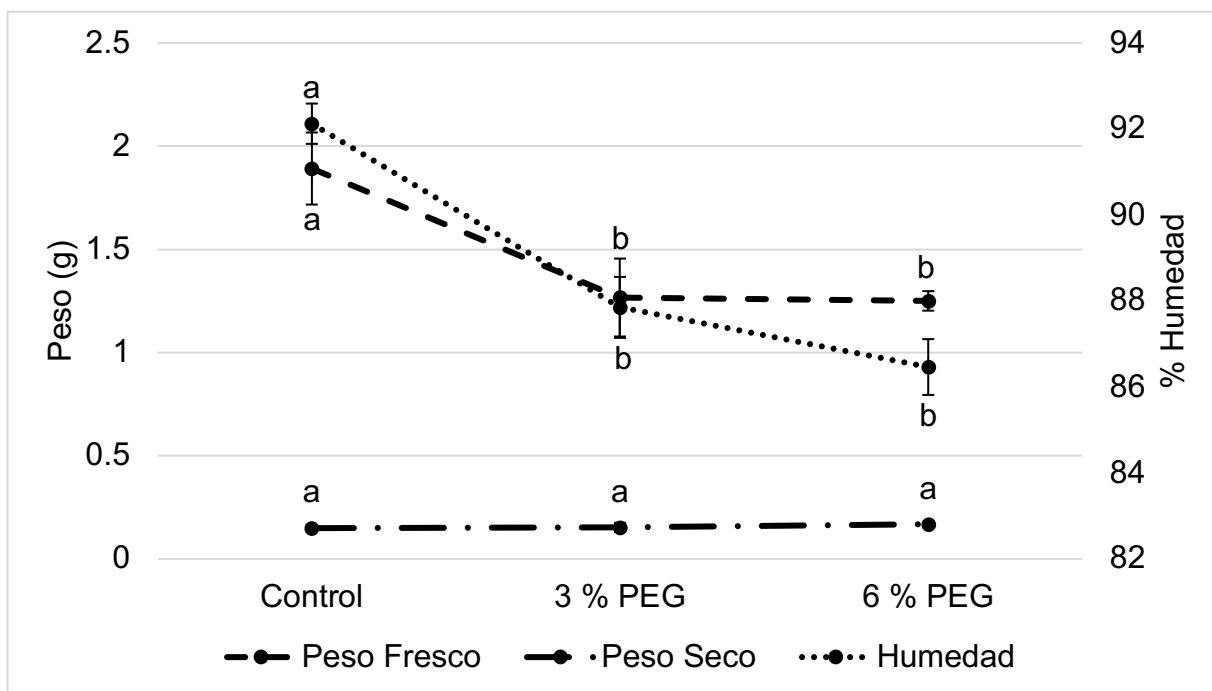


Figura 13. Efecto de las concentraciones de PEG en la maduración de embriones somáticos de *E. ebano*, en relación con el peso fresco, peso seco y contenido de humedad. †Se realizaron ocho mediciones por tratamiento. ‡Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$). §Las barras verticales indican el error estándar.

6.5 Histología

El análisis histológico de callos embriogénicos de la etapa de maduración, demostraron que las estructuras nodulares siguen un patrón normal de desarrollo del embrión. Se observó que la diferenciación de los embriones somáticos partió de células epidérmicas y subepidérmicas del tejido primario. Fue evidente la presencia de células meristemáticas en las regiones donde se originaban los embriones, las cuales presentaron un tamaño menor que las células consiguientes, con citoplasma denso y grandes núcleos redondos y teñidos (Figura 14). En el tratamiento de maduración sin reguladores, se presentaron embriones de fase corazón y torpedo, los cuales mostraron una protodermis bien definida, e incluso algunas estructuras ya no tenían

conexión con el tejido vascular (Figura 14A). Mientras que se observaron embriones corazón bajo la dosis de 3.78 μ M ABA y la protodermis se mantuvo bien desarrollada (Figura 14B). Tanto en el tratamiento control como con ABA, se observaron zonas no embriogénicas, las cuales describen Carvalho *et al.* (2013), como zonas celulares desorganizadas y con diferentes formas, así como vacuolas grandes que ocupan la mayor parte de la célula. Con 4 % de sacarosa, se presentaron estructuras de tipo torpedo, donde se evidencia la formación de los primordios cotiledonares, así como zonas de procámbium con células pequeñas y meristemáticas (Figura 14C). En cambio, con 3 % de PEG la protodermis y procámbium se presentaron bien definidas (Figura 14D). Estos resultados son similares a lo reportado en *Acacia mangium* (Xie y Hong, 2001), *Albizia lebbbeck* (Saeed and Shahzad, 2015), *Arachis glabrata* (Dolce *et al.*, 2018) y *Coffea canephora* (Márquez-López *et al.*, 2018).

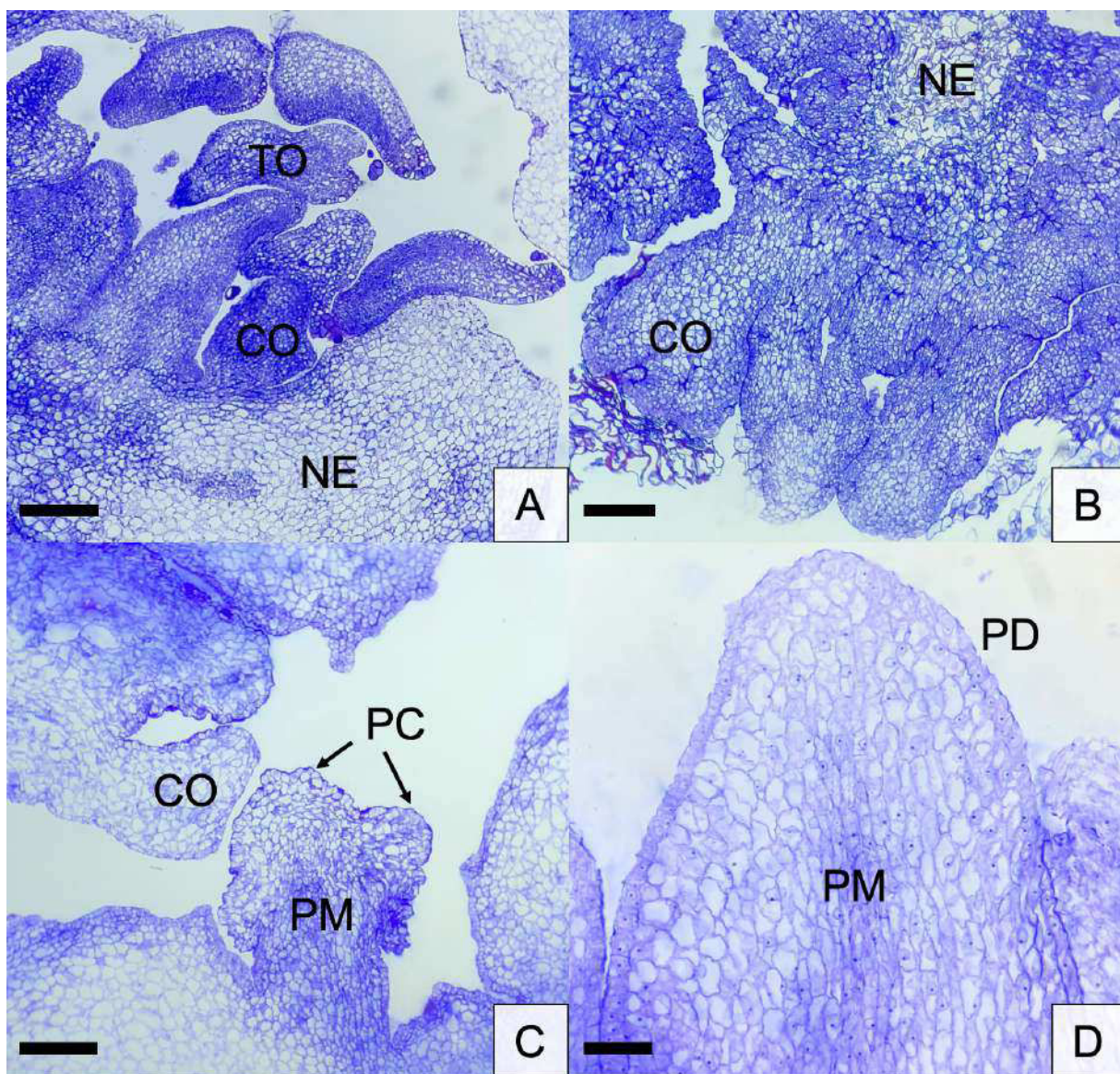


Figura 14. Cortes histológicos de callos embriogénicos de *E. ebano* en la etapa de maduración. A) Efecto del tratamiento sin reguladores, presentando embriones tipo corazón (CO), torpedo (TO) y la protodermis desarrollada (PD); B) Embrión corazón en 3.78 μM de ABA, cercano a una zona no embriogénica (NE); C) Embriones corazón y torpedo en 4 % de sacarosa, observándose los primordios cotiledonares (PC) y procámbium (PM); D) Efecto del 3 % de PEG en una estructura tipo torpedo con la zona de procámbium y protodermis. Barras: 150 μm en A-C; 20 μm en D.

6.6 Germinación de Embriones Somáticos

Embriones en fase torpedo y cotiledonar de cuatro y ocho semanas de maduración, sometidos a los tratamientos de germinación, presentaron diversas respuestas

(Figuras 15 y 16). Los embriones somáticos de cuatro semanas de maduración no presentaron diferencia significativa (sig. $p \leq 0.05$) entre los tratamientos, con porcentajes que no superaron el 50 % (Cuadro 8). Entre las respuestas más comunes fue el buen desarrollo de los cotiledones, pero fusionados (Figura 15A y D); así como la generación de callo no embriogénico y nula extensión de la radícula (Figura 15B-D). Mientras que los embriones de ocho semanas de maduración alcanzaron valores de germinación mayor al 60 % con 2.22 μM de BAP (sig. $p \leq 0.05$) (Cuadro 8). En cambio, en el tratamiento control y con 1.45 μM de AG₃, se indujo la formación normal de cotiledones, pero no hubo presencia de radícula (Figura 16A y C). En la mayoría de los tratamientos en los tiempos evaluados, se presentó la formación de callo no embriogénico de consistencia friable y áspera de color verde claro y amarillo (Figuras 15 y 16). Para evitar la generación de callo en los embriones, Heikrujam *et al.* (2014), sugieren que, una vez germinados se transfieran a un medio de cultivo sin reguladores y con una baja concentración de carbón activado. De manera general, en los tratamientos de germinación, la incidencia de radícula fue nula o pobre, presentando baja extensión y desarrollo. Las reducciones de la concentración mineral de los medios de cultivo para inducir la germinación de embriones somáticos, se ha reportado en *A. farnesiana* y *A. schaffneri* (Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000), *Prosopis laevigata* (Buendía-González *et al.*, 2012) y *A. lebbeck* (Saeed and Shahzad, 2015). El uso efectivo del BAP en la etapa de germinación se ha probado en *Acacia senegal* (Rathore *et al.*, 2012); mientras que la combinación con AG₃ ha resultado positiva en *Quercus rubra* (Vengadesan and Pijut, 2009).

Cuadro 8. Efecto de los reguladores BAP y AG₃ a cuatro semanas del subcultivo, en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de *E. ebano*, de cuatro y ocho semanas de maduración.

Tratamiento	Germinación (%)	
	Embriones 1 mes	Embriones 2 meses
Control‡	48.3 ± 8.1 a	51.6 ± 5.6 ab
2.22 µM BAP‡	47.1 ± 5.4 a	64.8 ± 6.2 a
4.44 µM BAP‡	45.6 ± 7.7 a	52.3 ± 7.7 ab
1.45 µM AG ₃ ‡	27.1 ± 6.8 a	27.5 ± 6.9 b
2.89 µM AG ₃ ‡	37.1 ± 4.8 a	33.7 ± 5.3 b
2.22 + 1.45 µM (BAP/AG ₃)‡	29.2 ± 8.5 a	45.1 ± 7.0 ab

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medio MS al 50 % + 2.68 µM ANA. §Medias más error estándar.

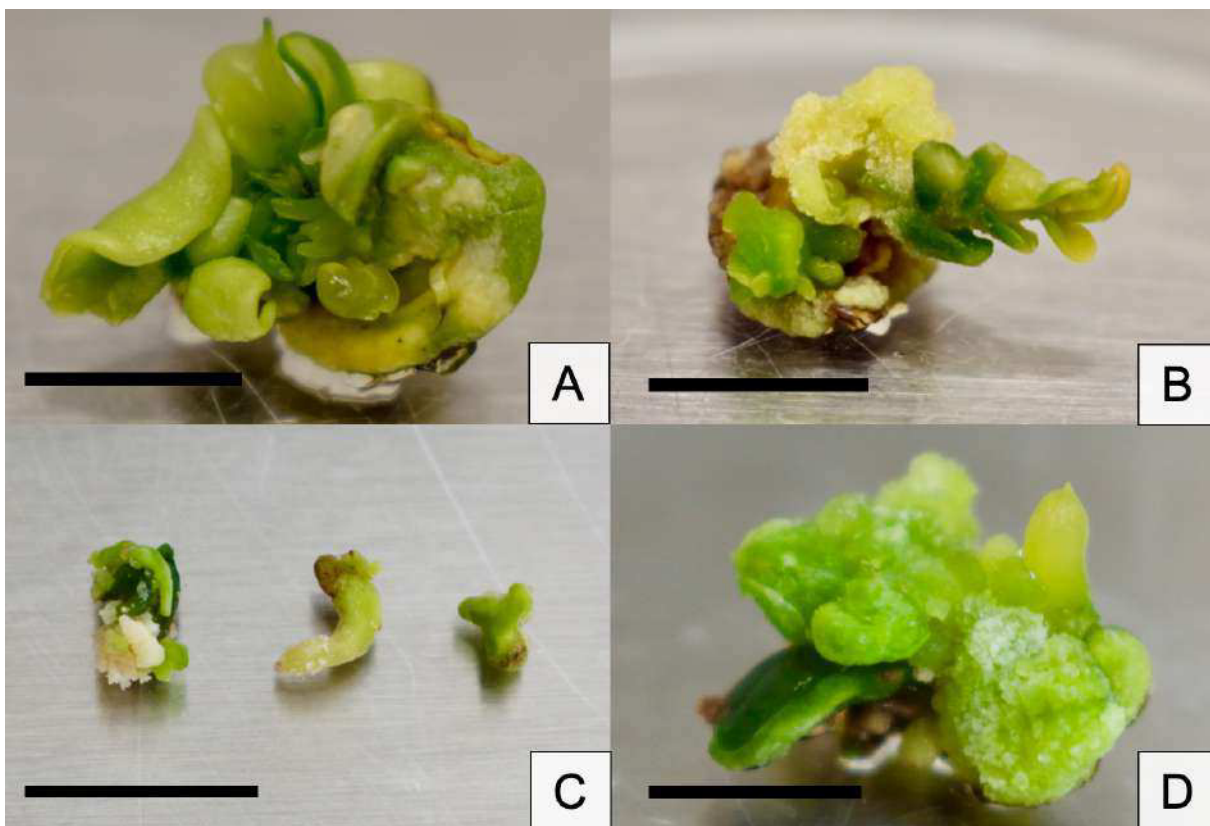


Figura 15. Efecto de BAP y AG_3 en la germinación de embriones somáticos de *E. ebano* de un mes de maduración. A) Grupo de embriones cotiledonares fusionados con $2.22 \mu\text{M}$ BAP; B) Embrión cotiledonar con formación de callo no embriogénico y sin radícula con $4.44 \mu\text{M}$ BAP; C) Embriones cotiledonares no germinados con $1.45 \mu\text{M}$ AG_3 ; D) Grupo de embriones fusionados con formación de callo no embriogénico con $2.22/1.45 \mu\text{M}$ BAP/ AG_3 . Barras: 1.0 cm en A-D.

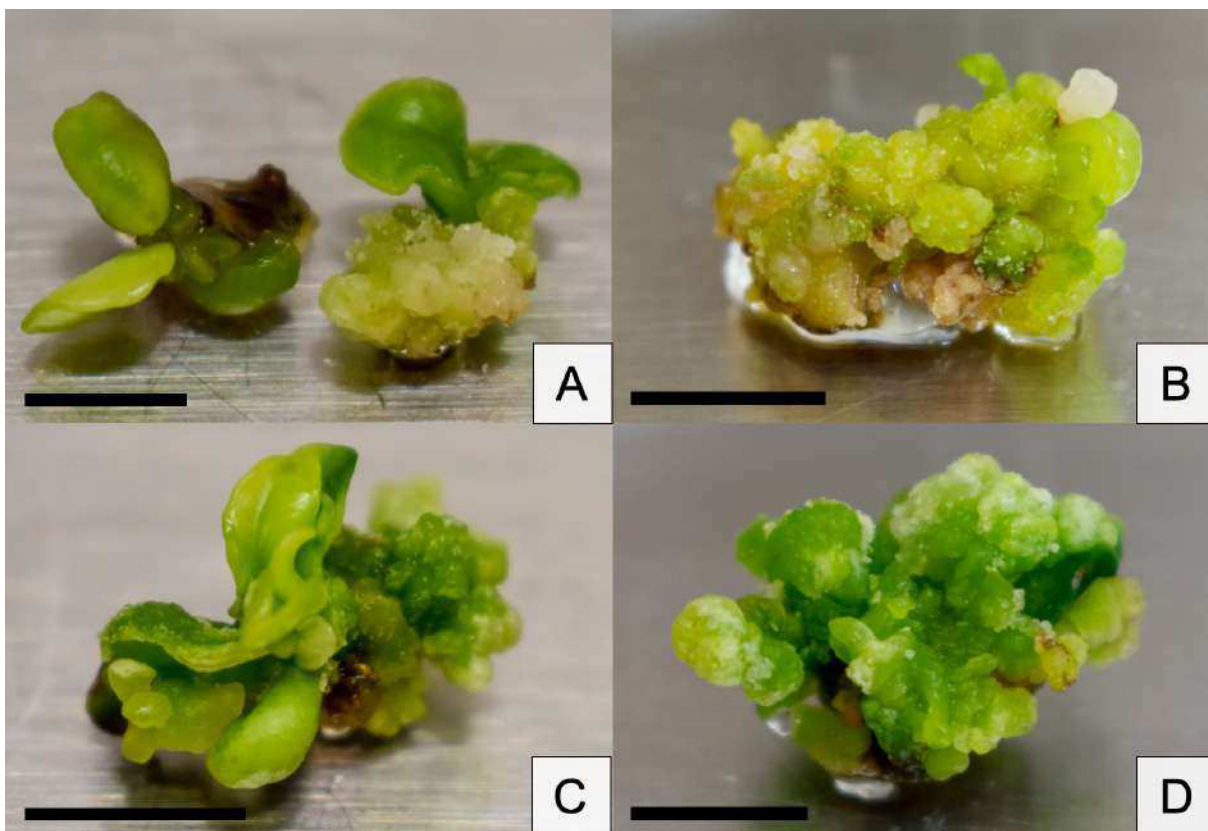


Figura 16. Efecto de BAP y AG₃ en la germinación de embriones somáticos de *E. ebano* de dos meses de maduración. A) Grupo de embriones cotiledonares sin formación de radícula en medio sin reguladores; B) Grupo de embriones fusionados con formación de callo no embriogénico con 4.44 μ M BAP; C) Embrión cotiledonar sin formación de radícula con 1.45 μ M AG₃; D) Formación de callo no embriogénico sobre embrión cotiledonar con 2.22/1.45 μ M BAP/AG₃. Barras: 1.0 cm en A-D.

7. CONCLUSIONES

1. En la etapa de establecimiento, las concentraciones de NaClO, disminuyeron la incidencia de contaminación en semillas inmaduras de *E. ebano*.
2. En la inducción de callo embriogénico, los explantes de *E. ebano* proliferan bajo los parámetros de 9.06 μM de 2,4-D y 10 % AC, en medio semisólido y bajo condiciones de total oscuridad.
3. La etapa de maduración de embriones somáticos de *E. ebano* depende de los suplementos incorporados al medio de cultivo, donde se demuestra que las concentraciones de sacarosa y PEG, permiten el desarrollo de las diferentes fases de maduración, así como su frecuencia.
4. Los parámetros de peso fresco y seco y contenido de humedad de los callos embriogénicos de *E. ebano*, pueden caracterizar su nivel de desarrollo y madurez, demostrando que el uso de PEG propicia a obtener embriones maduros de alta calidad.
5. Los estudios histológicos demostraron el origen y patrón de desarrollo de los embriones somáticos de *E. ebano*.
6. En la germinación, el uso de BAP y AG₃, fueron efectivos para promover la germinación de los embriones somáticos maduros de *E. ebano*, siendo los embriones de ocho semanas de madurez los que presentaron los mayores valores.

8. RECOMENDACIONES

En relación con las observaciones derivadas durante el desarrollo de esta investigación, se mencionan las siguientes recomendaciones:

1. Es importante seleccionar semillas totalmente inmaduras, ya que, en estas la eliminación de la testa retrasa menos el procedimiento de siembra, así como evitar el oscurecimiento en el medio de cultivo.
2. Se aconseja reducir el periodo de inducción de callo embriogénico en medios líquidos a máximo seis semanas, ya que a la larga pueden producir hiperhidratación e intoxicación en los callos.
3. Los intervalos de subcultivos en medio de proliferación se pueden ampliar cada tres semanas, para evitar el oscurecimiento de los callos.
4. Se recomienda agregar algún antioxidante como PVP o ácido ascórbico a los medios de inducción y proliferación para reducir el oscurecimiento de los callos en ambas etapas.
5. Podría ampliarse la etapa de pre-maduración a cuatro semanas, para reducir los efectos de oscurecimiento presentados en las etapas de inducción y proliferación.
6. Las concentraciones utilizadas de sacarosa podrían aumentarse para probar su efecto en la maduración; de igual forma, se puede optar por la elección de PEG de mayor peso molecular, como 8000 o 12,000 para probar su efecto en la maduración de los embriones.

7. Se propone utilizar otros tipos de auxina, en diferentes concentraciones y combinaciones, que permitan la inducción y elongación de la radícula en los embriones maduros.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alanís, G. J. 1996. Vegetación y flora de Nuevo León: una guía botánico-ecológica. Monterrey, Nuevo León: Consejo Consultivo para la preservación y fomento de la flora y fauna silvestre de Nuevo León. Nuevo León, México. 251 p.
- Alaniz, M. A. and J. H. Everitt. 1978. Germination of Texas ebony seeds. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society* 49(12):95-100.
- Baque, M. A., A. Elgirban, E. J. Lee, and K. Y. Paek. 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34:405-415.
- Buendía-González, L., M. E. Estrada-Zúñiga, J. Orozco-Villafuerte, F. Cruz-Sosa and E. J. Vernon-Carter. 2012. Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:287-296.
- Burns, J. A. and H. Y. Wetzstein. 1998. Embryogenic cultures of the leguminous tree *Albizia julibrissin* and recovery of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:55-59.
- Carvalho, M. A. F., R. Paiva, E. Alves, R. C. Nogueira, V. C. Stein. E. M. de Castro, P. D. O. Paiva and D. P. Vargas. 2013. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. *Braz. J. Bot.* 36:141-151.

- Cañedo-Ortiz, B. O., M. E. Pérez-Reyes and E. Pérez-Molphe-Balch. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A. schaffneri*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36:268-272.
- Correll, D. S. and M. C. Johnston. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Volume 6. Texas Research Foundation. Renner. Texas, USA. pp. 761-794.
- Dolce, N. R., M. M. Faloci and A. M. Gonzalez. 2018. In vitro plant regeneration and cryopreservation of *Arachis glabrata* (Fabaceae) using leaflet explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54:133-144.
- Egertsdotter, U. 1998. Somatic embryogenesis in *Picea* suspension cultures. In: Hall, R. (ed.). *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press. Louisville, KY, USA.
- Estrada, C. A. y J. S. Marroquín de la Fuente. 1992. Leguminosas del Centro-Sur de Nuevo León. *Reporte Científico*, 10. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. 258 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Informe principal. Roma, Italia. 339 p.
- Foroughbakhch, R., J. L. Hernández-Piñero, M. A. Alvarado-Vázquez, E. Céspedes-Cabriales, A. Rocha-Estrada and M. L. Cárdenas-Avila. 2009. Leaf biomass determination on Woody shrub species in semiarid zones. *Agroforest Syst* 77:181-192.
- Gaj, M. D. 2002. Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 37:93-98.
- George, E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. *Plant propagation by Tissue Culture*, 3rd ed. Volume 1. The Background. Springer, Netherlands. 501 p.

- Gómez-Flores, R., Y. Gracia-Vásquez, M. G. Alanís-Guzmán, P. Tamez-Guerra, R. Tamez-Guerra, C. García-Díaz, E. Monreal-Cuevas and C. Rodríguez-Padilla. 2009. In vitro antimicrobial activity and polyphenolics content of tender and mature *Ebenopsis ebano* seeds. *Medicinal Plants* 1(1):11-19.
- González, M. R. 1996. Evaluación de algunos parámetros nutricionales de la semilla de ébano -*Pithecellobium flexicaule* (Benth.)- relacionados con potenciales usos en la alimentación humana. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 130 p.
- Heikrujam, M., D. Kumar, S. Kumar, S. C. Gupta and V. Agrawal. 2014. High efficiency cyclic production of secondary somatic embryos and ISSR based assessment of genetic fidelity among the emblings in *Calliandra tweedii* (Benth.). *Scientia Horticulturae* 177:63-70.
- Jalali, M. A., H. B. Sirmandi and A. Hatamzadeh. 2017. Effects of carbohydrate source and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology* 20:29-35.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry. Principles and Practice*. Freeman W. H. & Co. San Francisco, California, USA. pp. 71-91.
- Kumar, S., V. Agrawal, and S. C. Gupta. 2002. Somatic embryogenesis in the woody legume *Calliandra tweedii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:77-80.
- Kumar, P. P. and C. S. Loh. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. In: Altman, A. and P. M. Hasegawa. (eds.). *Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century*. Elsevier. pp. 131-138.

- Márquez-López, R. E., C. Pérez-Hernández, A. Ku-González, R. M. Galaz-Ávalos and V. M. Loyola-Vargas. 2018. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma* 255:695-708.
- Mikula, A., M. Pozoga, M. Grzyb and J. J. Rybczynski. 2015. An unique system of somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb.: the importance of explant type, and physical and chemical factors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 123:467-478.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Pérez, M., M. Viejo, M. LaCuesta, P. Toorop and M. J. Cañal. 2015. Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus suber* L. somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 173:51-61.
- Prewein, C., M. Endemann, V. Reinohl, J. Salaj, V. Sunderlikova and E. Wilhem. 2006. Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. *Trees Struct Funct* 20:53-60.
- Quiroz-Figueroa, F., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos and V. M. Vargas. 2006. Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86:285-301.
- Rai, M. K., N. Akhtar and V. S. Jaiswal. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Sci. Hort.* 113:129-133.
- Rai, M. K., V. S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2008. Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 117:302-305.

- Rai, M. K., V. S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 121:233-236.
- Rajesh, M., G. Sivanandhan, K. Subramanyam, G. Kapildev, B. Jaganath, S. Kasthuriangan, M. Manickavasagam and A. Ganapathi. 2014. Establishment of somatic embryogenesis and podophyllotoxin production in liquid shake cultures of *Podophyllum hexadrum* Royle. *Industrial Crops and Products* 60:66-74.
- Rathore, J. S., M. K. Rai and N. S. Shekhawat. 2012. Induction of somatic embryogenesis in gum Arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd.]. *Physiol Mol Biol Plants* 18(4):387-392.
- Rechy-Carvajal, M. A. y E. von Roth-Rechy. 2004. Especies nativas del matorral espinoso del noreste mexicano con posibilidades de aprovechamiento industrial. *Madera y Bosques* 10(2):45-54.
- Saeed, T. and A. Shahzad. 2015. High frequency plant regeneration in Indian Siris via cyclic somatic embryogenesis with biochemical, histological and SEM investigations. *Industrial Crops and Products* 76:623-637.
- Shi, X., X. Dai, G. Liu and M. Bao. 2009. Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees* 23:1033-1042.
- Shoji, M., H. Sato, R. Nakagawa, R. Funada, T. Kubo and S. Ogita. 2006. Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. *Journal of Forest Research* 11:449-453.

- Sinha, R. K. and R. Mallick. 1993. Regeneration and multiplication of shoot in *Albizia falcataria*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32:259-261.
- Song, Y., S. Li, X. Bai and H. Zhang. 2018. Screening and verification of the factors influencing somatic embryo maturation of *Larix olgensis*. Journal of Forestry Research 29:1581-1589.
- Tomar, U. K. and S. C. Gupta. 1988. Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume – *Albizia richardiana* King. Plant Cell Reports 7:70-73.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2006. National Nutrient Database for Standard Reference. Online. Acceso: 14 de mayo de 2018. Disponible en: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=EBEB>
- Vengadesan, G., A. Ganapathi, V. R. Anbazhagan and R. P. Anand. 2002. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38:52-57.
- Vengadesan, G. and P. M. Pijut. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 97:141-149.
- Vires, R. A. 1986. Trees, shrubs, and Wood vines of the southwest. University Texas Press. Austin, Texas. 514 p.
- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69:233-249.
- Xie, D. Y. and Y. Hong. 2001. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 20:34-40.

You, C. R., T. J. Fan, X. Q. Gong, F. H. Bian, L. K. Liang and F. N. Qu. 2011. A high-frequency cyclic secondary embryogenesis system for the *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 107:233-242.

Zhang, J. W., J. H. Wang, Q. F. Li and J. Ma. 2014. Somatic embryogenesis of *Picea asperata* induced from immature embryos. *Scientia Silvae Sinica* 50:39-46.

CAPÍTULO 3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN *in vitro* DE HUIZACHE (*Vachellia farnesiana* [L.] WIGHT & ARN.)

1. RESUMEN

El huizache (*Vachellia farnesiana* [L.] Wight & Arn.), es una especie nativa del noreste de México. Tiene gran importancia ya que mejora la calidad de los suelos por su simbiosis con bacterias de género *Rhizobium*. Además, se emplea como especie ornamental y es tolerante a sequías. Entre los usos más importantes destaca su uso como forraje, producción de madera, leña y carbón y actualmente como antibacterial. La especie se propaga tradicionalmente por semilla, sin embargo, la descendencia presenta alta variabilidad genética. Es por esto, que se requieren métodos alternativos para su propagación clonal rápida en ejemplares élite. Dentro de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales, la embriogénesis somática es considerada la opción más viable para la regeneración de especies leñosas, ya que permite obtener embriones somáticos a partir de células somáticas, los cuales se originan en un medio artificial y condiciones axénicas y controladas. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de embriogénesis somática para su regeneración clonal *in vitro*. Para esto, se establecieron semillas inmaduras de *V. farnesiana* en tres medios de cultivo durante cuatro semanas, donde al finalizar el periodo, el medio MS permitió la mayor viabilidad de los explantes. Posteriormente, se subcultivaron ejes embrionarios más los cotiledones como explante para la inducción de callo embriogénico. En esta etapa se utilizó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

(0.0-6.79 μM) combinada con kinetina para la proliferación de callo, en medios semisólidos y líquidos, en condiciones de fotoperiodo u oscuridad. En estas condiciones, la concentración de 4.53 μM de 2,4-D en medio líquido y oscuridad permitió la proliferación de callo embriogénico. Después las masas embriogénicas se transfirieron a los tratamientos de maduración, en un medio MS más ácido abscísico (ABA) (3.78-30.24 μM), polietilenglicol 4000 (PEG) (3 y 6 %) o sacarosa (3-5 %). En estos tratamientos, la concentración de 5 % de sacarosa permitió el mayor número de embriones totales, sin embargo, los mayores valores de peso seco y contenido de humedad se presentaron en los tratamientos con 3 y 6 % de PEG. Asimismo, con análisis histológicos se determinó el patrón de desarrollo y morfología de los embriones somáticos en la etapa de maduración. Finalmente, los embriones somáticos maduros se transfirieron en tratamientos de germinación en medio MS al 50 % más 6-bencilaminopurina (BAP) (2.22 y 4.44 μM) o ácido giberélico (AG_3) (1.45 y 2.89 μM). En estas condiciones, los mayores porcentajes de germinación se presentaron utilizando las concentraciones de 1.45 y 2.89 μM de AG_3 en embriones somáticos de dos meses de maduración.

2. ABSTRACT

Sweet acacia (*Vachellia farnesiana* [L.] Wight & Arn.), is a native species of the northeast of Mexico. It has great importance since it improves the quality of the soils by its symbiosis with bacteria of genus *Rhizobium*. In addition, it is used as an ornamental species and is tolerant to drought. Among the most important uses are its use as fodder, wood production, firewood and coal and currently as antibacterial. The species propagates traditionally by seed; however, the offspring show high genetic variability. This is why alternative methods are required for rapid clonal propagation in elite specimens. Among the techniques of plant tissue culture, somatic embryogenesis is considered the most viable option for the regeneration of woody species, since it allows to obtain somatic embryos from somatic cells, which originate in an artificial environment and axenic conditions. controlled. Therefore, the objective of the present investigation was to develop a somatic embryogenesis protocol for its clonal regeneration *in vitro*. For this, immature *V. farnesiana* seeds were established in three culture media for four weeks, where at the end of the period, the MS medium allowed the greater viability of the explants. Subsequently, embryonic axes plus cotyledons were subcultured as an explant for the induction of embryogenic callus. In this stage, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0.0-6.79 μM) was used combined with kinetin for the proliferation of callus, in semisolid and liquid media, in photoperiod or dark conditions. Under these conditions, the concentration of 4.53 μM of 2,4-D in liquid medium and darkness allowed the proliferation of embryogenic callus. Then the

embryogenic masses were transferred to the maturation treatments, in an MS medium plus abscisic acid (ABA) (3.78-30.24 μM), polyethylene glycol 4000 (PEG) (3 and 6 %) or sucrose (3-5 %). In these treatments, the concentration of 5 % of sucrose allowed the greatest number of total embryos, however, the highest values of dry weight and moisture content were presented in the treatments with 3 and 6 % of PEG. Also, with histological analysis, the pattern of development and morphology of somatic embryos in the maturation stage was determined. Finally, mature somatic embryos were transferred in germination treatments in 50 % MS medium plus 6-benzylaminopurine (BAP) (2.22 and 4.44 μM) or gibberellic acid (GA_3) (1.45 and 2.89 μM). Under these conditions, the highest percentages of germination were presented using the concentrations of 1.45 and 2.89 μM of GA_3 in somatic embryos of two months of maturation.

3. INTRODUCCIÓN

En México, el segundo grupo más diverso de plantas corresponde a la familia Fabaceae. En el estado de Nuevo León, son elementos típicos de comunidades de matorral (Briones y Villarreal, 2001), donde destacan los géneros *Acacia*, *Prosopis*, *Ebenopsis*, *Caesalpinia* y *Havardia* (Estrada y Marroquín de la Fuente, 1992).

El género *Acacia* (familia Fabaceae, subfamilia Mimosaceae), comprende alrededor de 1200 especies, distribuidas ampliamente en Australia, África, América e India (Simmons, 1987). La mayoría de sus especies se utilizan para la obtención de leña, taninos, proteínas, tintas, pinturas, madera para pulpa, aromatizantes y gomas (Gantait *et al.*, 2018).

En el caso particular de *Vachellia farnesiana*, tiene un gran valor ecológico, ya que contribuye a controlar la erosión del suelo, así como a mejorar su fertilidad por la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* y micorrizas. En algunas zonas se utiliza como especie ornamental y tiene alta tolerancia a sequías (Niembro-Rocas, 1986; Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000; Gantait *et al.*, 2018).

Esta especie se propaga generalmente por semillas, las cuales tienen la particularidad de presentar alta vida de almacén y son fáciles de almacenar (Quoirin, 2003), sin embargo, los ejemplares silvestres están fuera del control de la progenie, por lo que presentar alta variabilidad genética (Dhawan, 1993; Quoirin, 2003). Por estas razones, la necesidad de implementar métodos de propagación clonal rápidos en individuos élite, es necesario.

El cultivo de tejidos vegetales reúne un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y manejo de cualquier parte de la planta, en condiciones asépticas, artificiales y controladas (De Filippis, 2014). Entre sus técnicas se encuentra la embriogénesis somática, proceso por el cual las células somáticas se diferencian en embriones somáticos (George *et al.*, 2008; Bhojwani and Dantu, 2013). La embriogénesis somática en especies del género *Acacia*, se ha llevado a cabo mediante diferentes fuentes de explantes, medios de cultivo y concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (Garg *et al.*, 1996; Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000; Vengadesan *et al.*, 2002; Quoirin, 2003; Rathore *et al.*, 2012).

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis General

La embriogénesis somática y regeneración *in vitro* en huizache (*Vachellia farnesiana* [L.] Wight & Arn.), se puede lograr mediante diferentes tipos de medio de cultivo, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, suplementos y condiciones de incubación.

3.1.2 Hipótesis Específicas

1. El establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *V. farnesiana*, se puede conseguir mediante el proceso de desinfestación en diferentes medios de cultivo.
2. La inducción de callo embriogénico en semillas inmaduras de *V. farnesiana*, se puede obtener mediante diferentes tipos de medio de cultivo, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, suplementos y condiciones de incubación.

3. La maduración de callos embriogénicos de *V. farnesiana* se puede lograr mediante diferentes suplementos adicionados al medio de cultivo, de acuerdo con su concentración y tiempo de exposición.
4. Los análisis histológicos en callos embriogénicos de *V. farnesiana*, pueden indicar el principio y modelo de desarrollo de los embriones somáticos.
5. La germinación de los embriones somáticos maduros de *V. farnesiana*, se puede conseguir con diferentes concentraciones de BAP y AG₃ en el medio de cultivo.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Establecer los métodos que permitan promover la embriogénesis somática y regeneración *in vitro* en huizache (*Vachellia farnesiana* [L.] Wight & Arn.).

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar diferentes medios de cultivo que permitan el establecimiento *in vitro*, de semillas inmaduras de *V. farnesiana*.
2. Establecer las concentraciones de 2,4-D/kinetina, tipo de medio y condiciones de incubación, que permitan la inducción de callo embriogénico en semillas inmaduras de *V. farnesiana*.
3. Definir el tipo, concentración y tiempo de exposición de suplementos incorporados al medio de cultivo, para estimular la maduración de callos embriogénicos de *V. farnesiana*.

4. Manifestar mediante análisis histológicos la etapa de maduración en callos embriogénicos de *V. farnesiana*, desarrollados en diferentes suplementos adicionados al medio de cultivo.
5. Especificar la concentración de las citocininas BAP y AG₃, que permita la germinación de embriones somáticos maduros de *V. farnesiana*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Clasificación y Descripción Botánica de *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn.

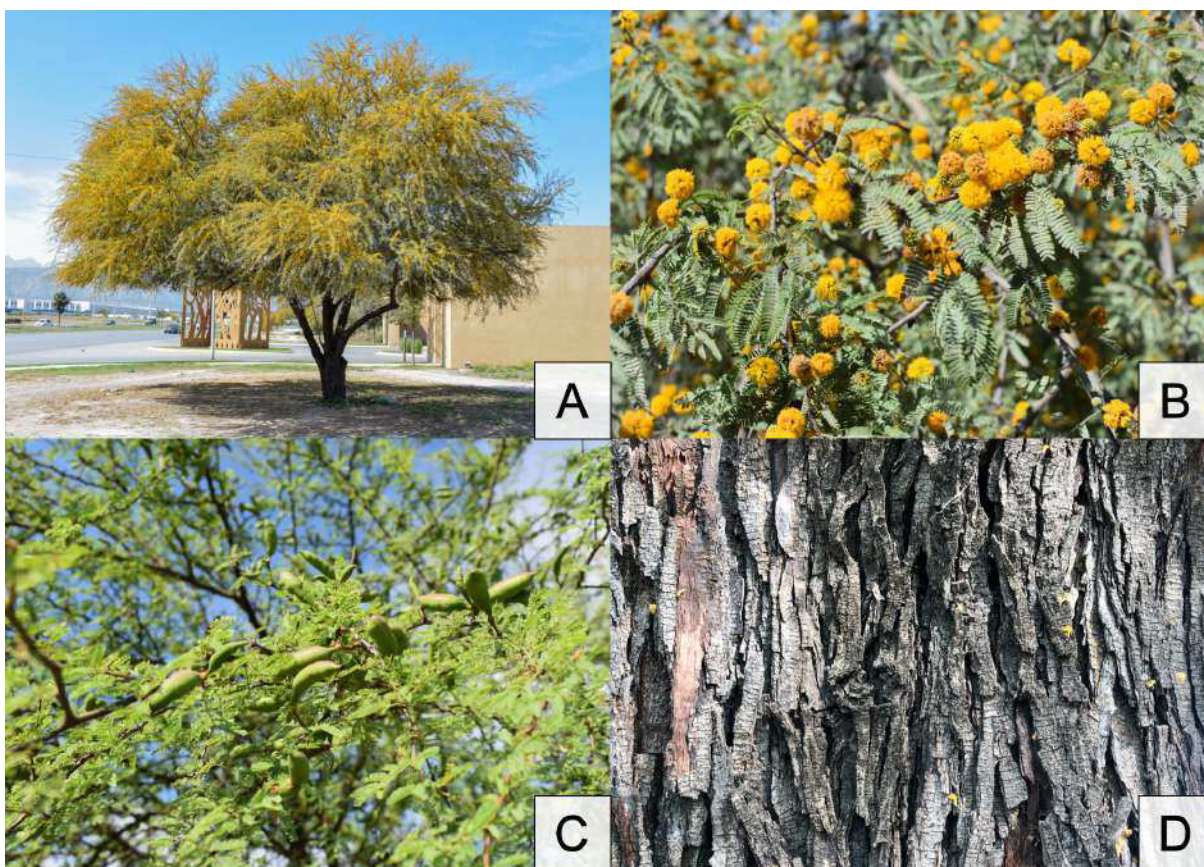


Figura 17. Características taxonómicas de *Vachellia farnesiana*. A) Árbol adulto de huizache en floración; B) Tipo de hojas e inflorescencias de huizache; C) Frutos inmaduros de huizache; D) Tallo y corteza de huizache adulto. Fuente: Ibarra-López, (2018).

4.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Eudicotyledoneae
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Mimosoideae
Tribu:	Acacieae
Género:	<i>Vachellia</i>
Especie:	<i>Vachellia farnesiana</i>

Fuente: Tame, (1992).

4.1.2 Descripción Botánica

4.1.2.1 Aspecto

Es un arbusto subperennifolio espinoso o raramente un árbol pequeño de 2 a 7 m de altura con varios tallos delgados y ramas largas y delgadas que crecen desde el nivel del suelo. Las ramas suelen ser glabras o casi glabras, de color violáceo a gris, con glándulas muy pequeñas. Las estípulas espinescentes usualmente cortas, de hasta 1.8 cm de largo, raramente más largas, nunca infladas (Tame, 1992; New South Wales Flora, 2010) (Figura 17A).

4.1.2.2 Hojas

Glándula peciolar nacida cerca de la mitad del pecíolo o ausente; hojas de 3 a 8 cm de largo, con una pequeña glándula en el pecíolo, pinnas de 2 a 6 pares; folíolos color gris verdosos, numerosos, lineales-oblongas de 3 a 5 mm de largo y 0.75 a 1.75 mm de ancho; pedúnculos delgados y largos de 1 a 4 cm, pubescentes, con un par de bractéolas en la parte superior, generalmente ocultos por la cabeza la flor (Correll and Johnston, 1970; Tame, 1992; New South Wales Flora, 2010) (Figura 17B).

4.1.2.3 Flores

En cabezuelas pequeñas de color amarillo, que se originan en las axilas de las espinas, solitarias o en grupos de 2 a 3 flores. Muy perfumadas, de 5mm de largo: cáliz verde, campanulado, papiráceo de 1.8 mm de largo; corola amarilla o verdosa, de 2.3 mm de largo. Las flores están apiñadas en bolas densas y mullidas y con frecuencia cubren el árbol en forma tal que éste da la sensación de una masa amarilla (Tame, 1992; Paiva, 1999) (Figura 17B).

4.1.2.4 Fruto

Vainas moreno-rojizas, semiduras, subcilíndricas, solitarias o agrupadas en las axilas de las espinas, de 2 a 10 cm de largo, terminadas en una punta aguda, valvas coriáceas, fuertes y lisas, tardíamente dehiscentes. Permanecen en el árbol después de madurar. Las semillas son reniformes, de 6 a 8 mm de largo, pardo-amarillentas, de olor dulce y con una marca linear en forma de "C". La testa de la semilla es impermeable al agua (Tame, 1992; Cervantes *et al.*, 1996; Paiva, 1999; New South Wales Flora, 2010) (Figura 17C).

4.1.2.5 Tallo

Presencia de varios troncos abocardando hacia arriba, rugosos y de color marrón oscuro a gris intenso, de forma obónica generalmente y numerosas ramas delgadas armadas con múltiples espinas rectas, emparejadas, largas y afiladas (Correll and Johnston, 1970; Tame, 1992; New South Wales Flora, 2010) (Figura 17D).

4.2 Usos e Importancia de Acacias

Es importante mencionar que anteriormente la especie *V. farnesiana* estaba clasificada en el género *Acacia*, sin embargo, comparten usos y aplicaciones entre ambos géneros.

Ambos géneros tienen la capacidad de reforestar y recuperar sitios abandonados (Skolmen, 1986), mejorar la salud del suelo, así como fuente de leña, madera y carbón (Palmberg, 1981). La mayoría de sus especies generan leña de alta calidad y algunas son fuente abundante de taninos, proteínas, tintas, pinturas, pulpas y gomas (Vengadesan *et al.*, 2002; Quoirin, 2003; Gantait *et al.*, 2018). Desde la perspectiva ambiental, pueden aclimatarse a condiciones atmosféricas extremas y, en consecuencia, adaptarse tanto a zonas áridas como húmedas (Gantait *et al.*, 2018). Además, varias especies son capaces de aumentar la fertilidad del suelo por su asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* y micorrizas, así como minimizar la erosión del suelo y ayudar a estabilizar dunas de arena (Skolmen, 1986; Quoirin, 2003; Gantait *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha reportado que los extractos de corteza y semillas de *V. farnesiana* tienen efecto inhibitorio en *Vibrio cholerae* (García *et al.*, 2006) y *Xanthomonas axonopodis* y *Clavibacter michiganensis* (Santi-Gadelha *et al.*, 2012).

4.3 Propagación Tradicional de Acacias

Las acacias son especies vegetales prolíficas y generalmente se propagan a partir de semillas, que tienen alta viabilidad y son fáciles de almacenar. También es posible su propagación por retoños, sin embargo, existe un alto grado de variabilidad genética en la progenie. Algunas especies como *A. mangium*, pueden propagarse asexualmente por esquejes, sin embargo, son trabajos laboriosos y que consumen mucho tiempo (Quoirin, 2003).

4.4 Embriogénesis Somática en Acacias

Hasta 2003, la embriogénesis somática en especies del género *Acacia*, se había reportado en: *A. auriculiformis*, *A. catechu*, *A. farnesiana*, *A. koa*, *A. magium*, *A. nilotica*, *A. schaffneri*, *A. senegal* y *A. tortilis*; donde el material vegetal utilizado como explante han sido embriones cigóticos y cotiledones inmaduros y endospermo inmaduro (Quoirin, 2003).

Rout *et al.* (1995), reportaron la ES en *A. catechu* por medio de cotiledones inmaduros. Utilizaron medio Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1980), suplementado con cinetina y ANA para la inducción; mientras que en la etapa de maduración se utilizaron dosis de prolina, y en la germinación de los embriones somáticos utilizaron MS sin RCV.

En cambio, Garg *et al.* (1996), reportan la ES y regeneración en *A. nilotica* a partir de endospermo inmaduro. Para la formación de callo embriogénico, sembraron los explantes en medio MS con dosis de 2,4-D, BAP y caseína hidrolizada, en donde a partir del tercer subcultivo se presentaron embriones somáticos. La germinación la llevaron a cabo en MS o B5 (Gamborg *et al.*, 1968), suplementados con glutamina, caseína hidrolizada y agua de coco.

La ES y la regeneración de plantas de *A. farnesiana* y *A. schaffneri* a partir de embriones cigóticos inmaduros fue desarrollada por Cañedo-Ortiz *et al.* (2000). Utilizaron medio MS con 2,4-D y cinetina para inducir callo. En la etapa de maduración usaron el mismo medio sin RCV o con dosis de ABA. Finalmente, la germinación de los embriones se estableció mediante medio MS y sulfato de adenina.

Mediante embriones cigóticos inmaduros de *A. mangium*, Xie and Hong (2001), lograron la inducción de ES. La formación de masas embriogénicas se obtuvo en medio MS con TDZ, AIA y aminoácidos. La maduración de los embriones somáticos se realizó en dos etapas, la primera en medio MS a 50 % de sales inorgánicas y 5.0 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃); la segunda etapa consistió en el mismo medio anterior, pero con 50 g L⁻¹ de sacarosa.

En su investigación, Vengadesan *et al.* (2002), produjeron embriones somáticos de *A. sinuata* con hojas jóvenes como explantes mediante cultivos en suspensión. Para la inducción de callo embriogénico utilizaron medio MS con 2,4-D y BAP, aunque también obtuvieron resultados positivos utilizando agua de coco. Para la maduración de los embriones somáticos, evaluaron el efecto de varias auxinas, citocininas, carbohidratos y aminoácidos, obteniendo los mejores resultados con dosis de glutamina y sacarosa.

Nanda and Rout (2003), establecieron la metodología para la ES de *A. arabica* utilizando embriones cigóticos inmaduros. El establecimiento de los explantes se realizó en medio MS con BAP y 2,4-D. En la etapa de proliferación se utilizaron diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D, mientras que, en la etapa de germinación de los embriones maduros, se utilizaron concentraciones de BAP y ABA.

Por su parte, Rathore *et al.* (2012), obtuvieron la ES en *A. senegal* a partir de cotiledones inmaduros. La inducción de ES se logró en medio MS con diferentes concentraciones de 2,4-D, cinetina y glutamina. De igual manera, la maduración de los embriones se obtuvo mediante concentraciones de glutamina en el medio y, finalmente la germinación de los embriones somáticos maduros se estableció con dosis de BAP.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del Estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Unidad Marín, UANL, ubicado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, Marín, N. L.; y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, UANL, localizado en Av. Francisco Villa s/n, Col. Ex Hacienda “El Canadá”, Gral. Escobedo, N. L., durante marzo 2016 a junio de 2018.

5.2 Material Vegetal

Se emplearon vainas inmaduras de huizache (*Vachellia farnesiana* [L.] Wight & Arn.), las cuales se recolectaron de ejemplares adultos en fructificación, ubicados en la Facultad de Agronomía, Unidad Marín, UANL. Se utilizaron semillas inmaduras como explantes.

5.3 Desinfestación

Las vainas inmaduras se lavaron superficialmente con detergente comercial líquido (Axion®) y se enjuagaron con agua potable (Figura 18A). A continuación, se retiraron las semillas y se colocaron en 100 mL de agua potable, 5.0 mL de Axion® y 3.0 mL de blanqueador comercial (Cloralex®) y se mantuvieron en agitación en tres lapsos de 10 min cada uno; al finalizar cada lapso se enjuagaron con agua potable (Figura 18B y C). Después se colocaron en una solución fungicida, bactericida y antioxidante, a base

de 2.0 g L⁻¹ de Final Bacter[®] (sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de oxitetraciclina 6.0 %), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar[®] Gold (azoxistrobin 18 %), 400 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 400 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 2.0 mL L⁻¹ de bactericida vegetal (Microdyn[®]) y 30 g L⁻¹ de sacarosa, durante 90 min en agitación. Concluido el proceso se enjuagaron con agua bidestilada (Figura 18D).

En seguida, las semillas de huizache se llevaron a una campana de flujo laminar y fueron inmersas etanol 96° por 60 segundos, seguido de un enjuague con agua bidestilada esterilizada, para después colocarlos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.62 % (30 % v/v Cloralex[®]), más 0.02 % de Tween-20 por 20 min (Figura 18E). Finalizado el proceso de desinfestación, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada, se retiró la testa y se colocaron en una solución antioxidante de 400 mg L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona), hasta la siembra (Figura 18F, G y H).

5.4 Preparación del Medio de Cultivo

5.4.1 Establecimiento

En la etapa de establecimiento se sembraron las semillas de huizache en las sales básicas de MS (Murashige and Skoog, 1962), DCR (Gupta and Durzan, 1985) y GD (Gresshoff and Doy, 1972), los cuales se adicionaron con vitaminas, mioinositol y sacarosa (Apéndice: Cuadros 1A, 2A y 3A); suplementados con 9.06 µM de 2,4-D y 1.0 mL L⁻¹ de Cloralex[®]. El pH de los medios se ajustó a 5.7 ± 0.02, con KOH y HCl 1.0 N y se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel[™]. Finalmente se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL y se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm⁻² por 15 min. Los cultivos se incubaron en total oscuridad a 24 ± 2 °C durante cuatro semanas.

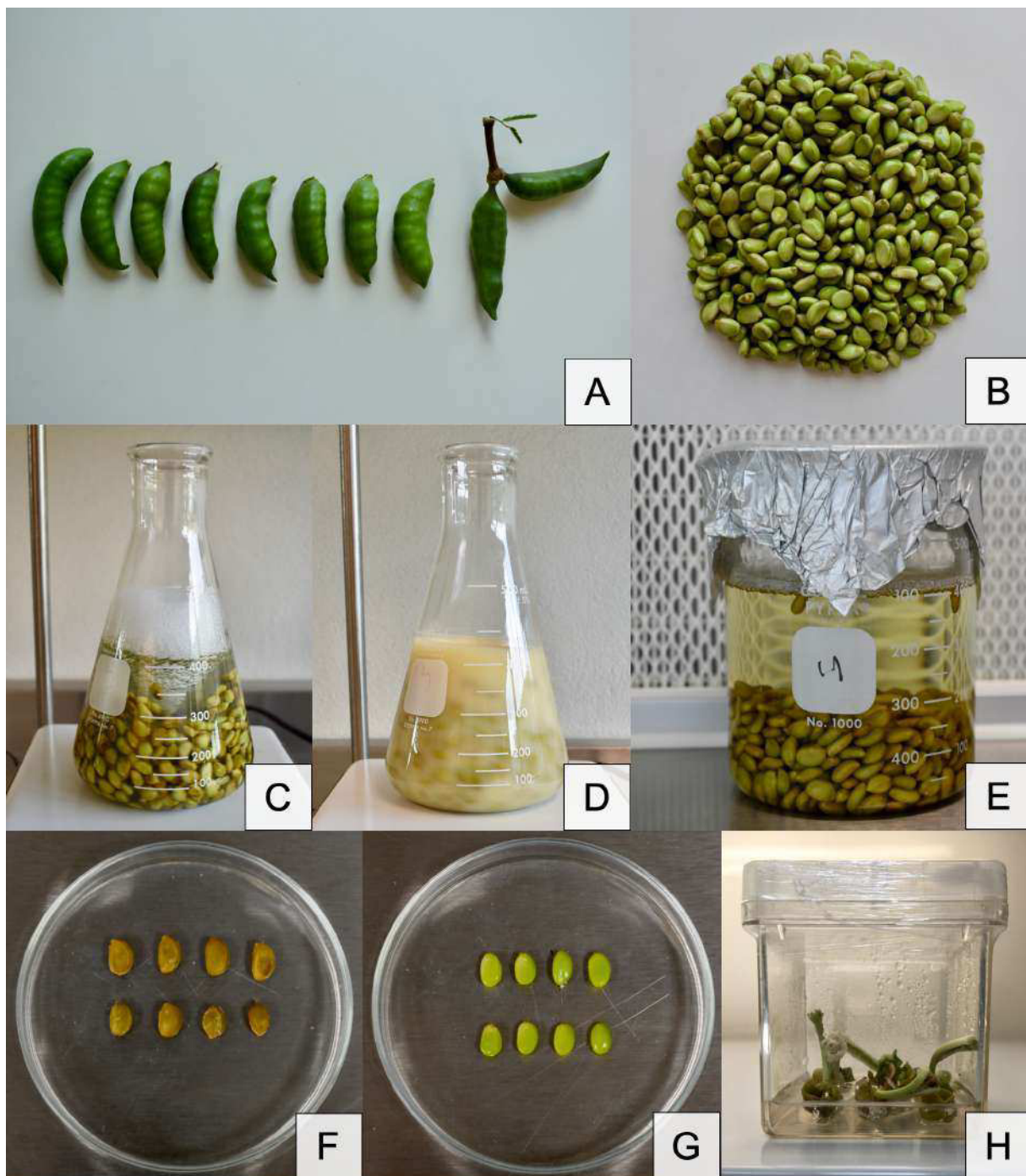


Figura 18. Proceso de desinfección de semillas de *V. farnesiana*. A-B) Vainas y semillas inmaduras de huizache; C) Lavado en agua potable y jabón líquido; D) Solución bactericida-fungicida; E) Inmersión en 1.62 % de NaClO y agua bidestilada; F-G) Eliminación de la testa de la semilla; H) Siembra *in vitro*.

5.4.2 Inducción de Callo Embriogénico

Plántulas *in vitro* de cuatro semanas de huizache se seccionaron para dejar como explante los cotiledones más el eje embrionario. Los explantes se subcultivaron en las sales básicas MS, suplementado con los componentes descritos anteriormente y se adicionaron con las concentraciones de 2.26, 4.53 y 6.79 μM de 2,4-D más 2.32 μM de kinetina. Además de un medio MS sin reguladores de crecimiento como control. El pH se ajustó como se describe anteriormente. Los medios de cultivo se utilizaron líquidos y semisólidos. En los semisólidos se agregó 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™. Ambos tipos de medios se colocaron en cajas Magenta™ de 250 mL y esterilizaron bajo las condiciones descritas. Los medios semisólidos se incubaron en total oscuridad o fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 \pm 2 °C durante cuatro semanas; mientras que los cultivos líquidos se colocaron en un agitador orbital a 80 rpm en total oscuridad o fotoperiodo, bajo la misma temperatura y permanencia descrita anteriormente.

5.4.3 Proliferación de Callo Embriogénico

Una vez finalizada la etapa de inducción, los callos embriogénicos se subcultivaron a un medio de proliferación utilizando medio MS basal adicionado con los componentes mencionados y 4.07 μM de 2,4-D más 2.32 μM de kinetina, por seis semanas con intervalos de subcultivo a medio nuevo cada dos semanas y se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 24 \pm 2 °C (Figura 21A y B).

5.4.4 Maduración de Embriones Somáticos

Callos embriogénicos en fase globular de la etapa de proliferación se transfirieron a un medio de pre-maduración, el cual consistió en un medio MS basal adicionado con los componentes descritos más 1.0 g L^{-1} de carbón activado. El pH fue 5.7, solidificado con 4.5 g L^{-1} de Phytigel™ y esterilizado a 1.2 kg cm^{-2} de presión por 15 min. Los cultivos se incubaron por dos semanas a un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 21C). Al término de la etapa de pre-maduración, los callos embriogénicos se subcultivaron a los tratamientos de maduración, utilizando MS basal más ácido abscísico (ABA) a 3.78, 7.57, 15.12 y $30.24 \text{ } \mu\text{M}$ o polietilenglicol 4000 (PEG) a 3 y 6 %; además de tres tratamientos en medio MS con macromelementos al 50 % y sacarosa a 3, 4 y 5 %. Como tratamiento control se utilizó medio MS basal sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó como se describe anteriormente y solidificados con 4.5 g L^{-1} de Phytigel™. Los medios se esterilizaron bajo las mismas condiciones anteriores, a excepción de los tratamientos con ABA, el cual se adicionó al medio después de la esterilización, utilizando filtro Millipore (Millex®) de $0.22 \text{ } \mu\text{m}$. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante ocho semanas.

5.4.5 Germinación de Embriones Somáticos

Embriones en fase torpedo y cotiledonar de cuatro y ocho semanas de maduración, se transfirieron a los tratamientos de germinación utilizando medio MS basal reducido al 50 %, suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) a 2.22 y $4.44 \text{ } \mu\text{M}$ y ácido giberélico (AG_3) a 1.45 y $2.89 \text{ } \mu\text{M}$ y la combinación de $2.22/1.45 \text{ } \mu\text{M}$ BAP/ AG_3 , todos

combinados con 2.68 μM de ácido 1-naftalenacético (ANA). Como control se utilizó medio MS basal al 50 % sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5.7 y se solidificaron con 4.5 g L^{-1} de Phytigel™. Los medios de cultivo se esterilizaron bajo las condiciones antes mencionadas, a excepción de los tratamientos con AG₃, el cual fue adicionado al medio después de la esterilización con filtro Millipore. Los cultivos se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 24 ± 2 °C durante cuatro semanas.

5.5 Contenido de Humedad en Embriones Somáticos

Se tomó el peso fresco y seco (g) y el contenido de humedad (%), de cada tratamiento de maduración utilizado. Los callos frescos fueron secados a 60 °C en un horno de calentamiento, hasta obtener peso constante. Ambos pesos se midieron en una balanza analítica Adventurer™ (Ohaus®, USA). El contenido de humedad se calculó de la siguiente manera: $\frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$ (Pérez *et al.*, 2015). Fueron utilizadas ocho repeticiones por tratamiento.

5.6 Histología

Para la identificación estructural, se seleccionaron callos embriogénicos de los tratamientos más representativos de la etapa de maduración, después de seis semanas de iniciar la etapa. Se seleccionaron muestras de 0.5 cm^3 que se fijaron en una solución FAA (10 % formaldehído, 50 % etanol, 5 % ácido acético glacial, 35 % agua bidestilada) (Jensen, 1962), a 4 °C por 24 h. Después se deshidrataron en series de alcohol isopropílico [50, 70, 80, 90, y 2 \times 100 % (v/v)] y xileno [50 % alcohol

isopropílico – 50 % xileno, y 2 × xileno puro], luego embebidas en parafina (2 ×). A continuación, las muestras se orientaron y montaron en parafina. Los cortes se efectuaron en posición anterior y posterior a 4 µm de grosor en un micrótopo automático (Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific, USA).

Los cortes se desparafinaron en xileno (100 %), etanol-xileno (50-50) y series de alcoholes (etanol 100 % y etanol 96°), y después se tiñeron con O-safranina (1.0 %) y cristal violeta (1.0 %), seguido de series de alcoholes (etanol 96° × 2 y etanol 100 %), etanol-xileno (50-50) y xileno (100 % × 2). Finalmente, las muestras se montaron en resina sintética y observadas en un microscopio Labomed CxL (Labo America Inc., USA).

5.7 Diseño Experimental

En la etapa de establecimiento *in vitro* se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y 10 repeticiones. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, oscurecimiento y callogénesis en los explantes a cuatro semanas después de la siembra.

Para la inducción de callo embriogénico el experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2x2, donde el factor A fueron las concentraciones de 2,4-D, el factor B el tipo de medio y el factor C las condiciones de incubación, dando un total de 16 tratamientos y cinco repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de callo embriogénico a cuatro semanas después del subcultivo.

La etapa de maduración de los embriones somáticos se estableció también en un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y 10 repeticiones. Las variables

evaluadas fueron: número de embriones totales en sus diferentes fases y la frecuencia de maduración que se calculó de la siguiente manera:

$\frac{\text{número de embriones cotiledonares} \times 100}{\text{número de embriones totales}}$, a cuatro y ocho semanas después de la transferencia.

En cambio, en la etapa de germinación fue utilizado un diseño completamente al azar con seis tratamientos y seis repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de germinación a cuatro semanas de la transferencia, en embriones somáticos maduros de cuatro y ocho semanas de maduración.

En todas las etapas la unidad experimental fue un recipiente de vidrio o una caja Magenta™. En la etapa de establecimiento e inducción se colocaron cuatro semillas o explantes, mientras que en la maduración se colocaron cuatro masas embriogénicas de 200 mg aproximadamente, y en la etapa de germinación se colocaron de dos a cuatro embriones somáticos maduros.

Los porcentajes de contaminación, oscurecimiento, inducción de callo y germinación se transformaron mediante la función *Arcoseno*.

Los efectos principales y su interacción en la etapa de inducción de callo embriogénico se evaluaron mediante un modelo lineal general univariado, y posteriormente se realizó un análisis de varianza de un factor para evaluar todos los tratamientos. De la misma forma se realizó un análisis de varianza se realizó para las etapas de establecimiento, maduración, germinación y las mediciones de peso fresco y seco y contenido de humedad. La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey $p \leq 0.05$ y los resultados se analizaron mediante el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento

El procedimiento de desinfestación utilizado en la etapa de establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *V. farnesiana*, fue efectivo en los medios de cultivo utilizados (Figura 19). No se presentó diferencia significativa en la variable contaminación (sig. $p \leq 0.05$), donde los valores no excedieron el 10 % (Cuadro 9). En cambio, la presencia de oscurecimiento se vio afectada por el tipo de medio de cultivo, donde los explantes, particularmente cotiledones, fueron más susceptibles al medio GD (Cuadro 9; Figura 19C). Mientras que la generación de callo fue reducida, pero se marco una diferencia del medio MS contra el medio DCR (Cuadro 9; Figura 19A y B). En la mayoría de las repeticiones del experimento, se presentó la germinación de las semillas, desarrollándose satisfactoriamente la radícula, hipocótilo y epicótilo. Según Gantait *et al.* (2014), el cultivo *in vitro* aséptico dependen del estado de desarrollo del explante, así como la vulnerabilidad de las especies a numerosos patógenos.

Cuadro 9. Efecto del medio de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis en semillas inmaduras de *V. farnesiana*, en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.

Tratamiento	% Contaminación	% Oscurecimiento	% Callogénesis
1 MS	9.0 ± 4.1 a	15.81 ± 5.4 c	15.69 ± 6.4 a
2 DCR	5.29 ± 2.01 a	51.03 ± 6.6 b	8.82 ± 4.06 ab
3 GD	0.0 ± 0.0 a	90.0 ± 13.5 a	0.0 ± 0.0 b

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

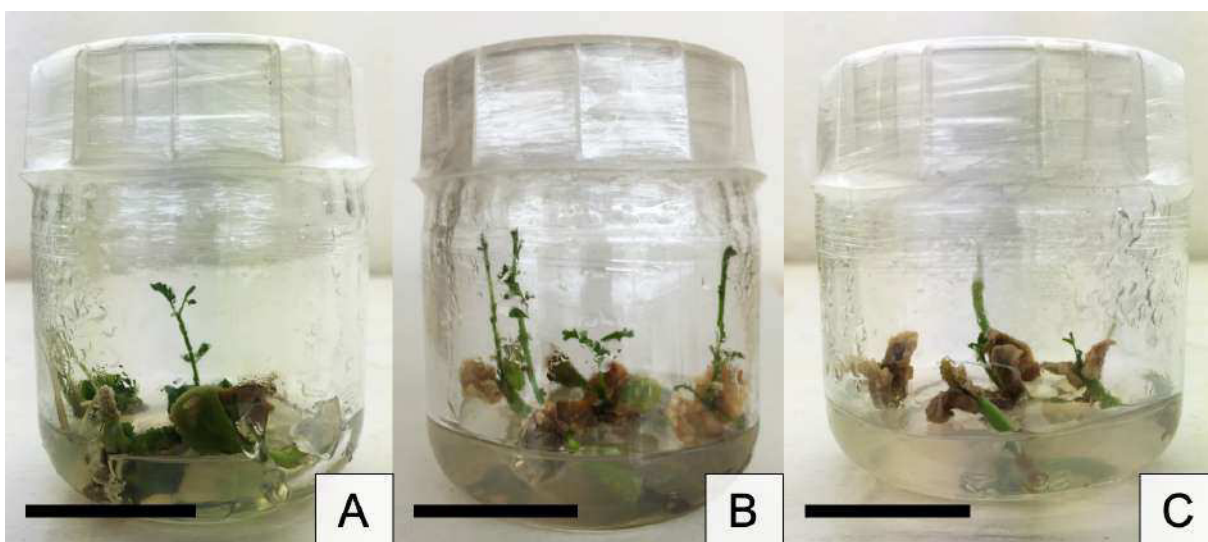


Figura 19. Efecto de los medios de cultivo en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *V. farnesiana*. A) MS; B) DCR; C) GD. Barras: 2.0 cm en A-C.

6.2 Inducción de Callo Embriogénico

En la evaluación del efecto individual en la etapa de inducción de callo embriogénico, solo se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en la condición de tipo de medio (Cuadro 10B). En este caso, los medios de cultivo de tipo líquido permitieron la mayor proliferación de callo en explantes de *V. farnesiana* (Figura 20D-I). A pesar de obtener generación de callo embriogénico en los medios semisólidos, este no se presentó en

todos los explantes y algunos comenzaron a presentar oscurecimiento (Figura 20A-C). En ambos tipos de medios, los callos obtenidos fueron nodulares, sin embargo, en los medios líquidos, las masas embriogénicas se aislaron del tejido principal (Figura 20D-I). Estos resultados son similares a lo reportado en *A. farnesiana* y *A. schaffneri* (Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000) y *A. sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002), utilizando medios líquidos para la proliferación de callo embriogénico. Egertsdotter, (1998), menciona que la agitación persistente en los medios líquidos fracciona la conexión del tejido principal, liberando las masas embriogénicas, que posteriormente continúan desarrollándose. Pese a estos resultados, los medios semisólidos han sido exitosos en *A. catechu* (Rout *et al.*, 1995), *A. nilotica* (Garg *et al.*, 1996) y *A. senegal* (Rathore *et al.*, 2012).

En relación con las concentraciones de 2,4-D, estadísticamente no son diferentes ($p \leq 0.05$), no superando el 40 % de inducción en todos los casos (Cuadro 10A). No obstante, es primordial mencionar que el tratamiento control sin reguladores de crecimiento, presentó valores muy cercanos que cuando se utilizó 2,4-D y kinetina (Figura 20A, D y G). El uso de la auxina 2,4-D también ha reportado generación de callos en diversos explantes de las especies *A. mangium* (Xie and Hong, 2001), *A. sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002), *A. arabica* (Nanda and Rout, 2003) y *A. senegal* (Rathore *et al.*, 2012).

En cuanto a la condición de incubación, fotoperiodo y total oscuridad, no se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), sin embargo, en valores fue mayor la incidencia de callo embriogénico incubando los cultivos en oscuridad (Cuadro 10C). Bajo esta condición, los callos generados presentaron coloraciones crema, amarillo claro y marrón (Figura 20C, G, H e I). De acuerdo con George *et al.* (2008), ciertos cultivos

celulares y tejidos no organizados como callos, pueden crecer exitosamente bajo condiciones de oscuridad.

Cuadro 10. Efecto individual de la concentración de 2,4-D y KIN (A), tipo de medio de cultivo (B) y condiciones de incubación (C), en la inducción de callo embriogénico de explantes de *V. farnesiana*, a cuatro semanas del subcultivo.

(A) Concentración		% Callo embriogénico
2,4-D μM	KIN μM	
0.0	0.0	32.01 \pm 6.8 a
2.26	2.32	31.16 \pm 6.8 a
4.53	2.32	37.73 \pm 6.8 a
6.79	2.32	29.54 \pm 6.8 a
(B) Tipo de medio		
Semisólido		17.71 \pm 4.8 b
Líquido		46.51 \pm 4.8 a
(C) Condición		
Fotoperiodo		26.78 \pm 4.8 a
Oscuridad		37.44 \pm 4.8 a

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

Por último, evaluando el efecto conjunto de los tres factores, la concentración de 4.53 μM 2,4-D, en medio líquido y en total oscuridad, permitió la mayor inducción y proliferación de callo embriogénico ($p \leq 0.05$) (Cuadro 11: Figura 20I). Empero, se obtuvieron porcentajes muy cercanos de callos embriogénico con 2.26 μM 2,4-D en medio líquido y oscuridad, así como en el control sin reguladores, en medio líquido y bajo condiciones de oscuridad (Cuadro 11; Figura 20G y H). De los tratamientos que permitieron la inducción de callo embriogénico, este comenzó su desarrollo en el eje embrionario y se desplazó a los cotiledones. Gantait *et al.* (2018), mencionan que la

proliferación del callo y calidad de respuesta morfogénica depende del tipo y concentración de nutrientes minerales y reguladores de crecimiento, suministrados en los medios de cultivo.

Cuadro 11. Efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *V. farnesiana*, a cuatro semanas del subcultivo.

Tratamiento	2,4-D μM	KIN μM	Medio	Condición	% CE [‡]	
1	0.0	0.0	Semisólido	Fotoperiodo	12.0 \pm 6.3	ab
2	2.26	2.32	Semisólido	Fotoperiodo	0.0 \pm 0.0	b
3	4.53	2.32	Semisólido	Fotoperiodo	18.0 \pm 7.8	ab
4	6.79	2.32	Semisólido	Fotoperiodo	26.2 \pm 10.9	ab
5	0.0	0.0	Semisólido	Oscuridad	9.0 \pm 3.4	ab
6	2.26	2.32	Semisólido	Oscuridad	21.35 \pm 9.2	ab
7	4.53	2.32	Semisólido	Oscuridad	18.0 \pm 8.1	ab
8	6.79	2.32	Semisólido	Oscuridad	37.1 \pm 14.6	ab
9	0.0	0.0	Líquido	Fotoperiodo	46.1 \pm 14.3	ab
10	2.26	2.32	Líquido	Fotoperiodo	44.2 \pm 14.4	ab
11	4.53	2.32	Líquido	Fotoperiodo	39.9 \pm 16.5	ab
12	6.79	2.32	Líquido	Fotoperiodo	27.8 \pm 18.2	ab
13	0.0	0.0	Líquido	Oscuridad	60.9 \pm 7.7	ab
14	2.26	2.32	Líquido	Oscuridad	59.08 \pm 12.7	ab
15	4.53	2.32	Líquido	Oscuridad	67.04 \pm 14.1	a
16	6.79	2.32	Líquido	Oscuridad	27.0 \pm 14.3	ab

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Callo embriogénico. [§]Medias más error estándar.

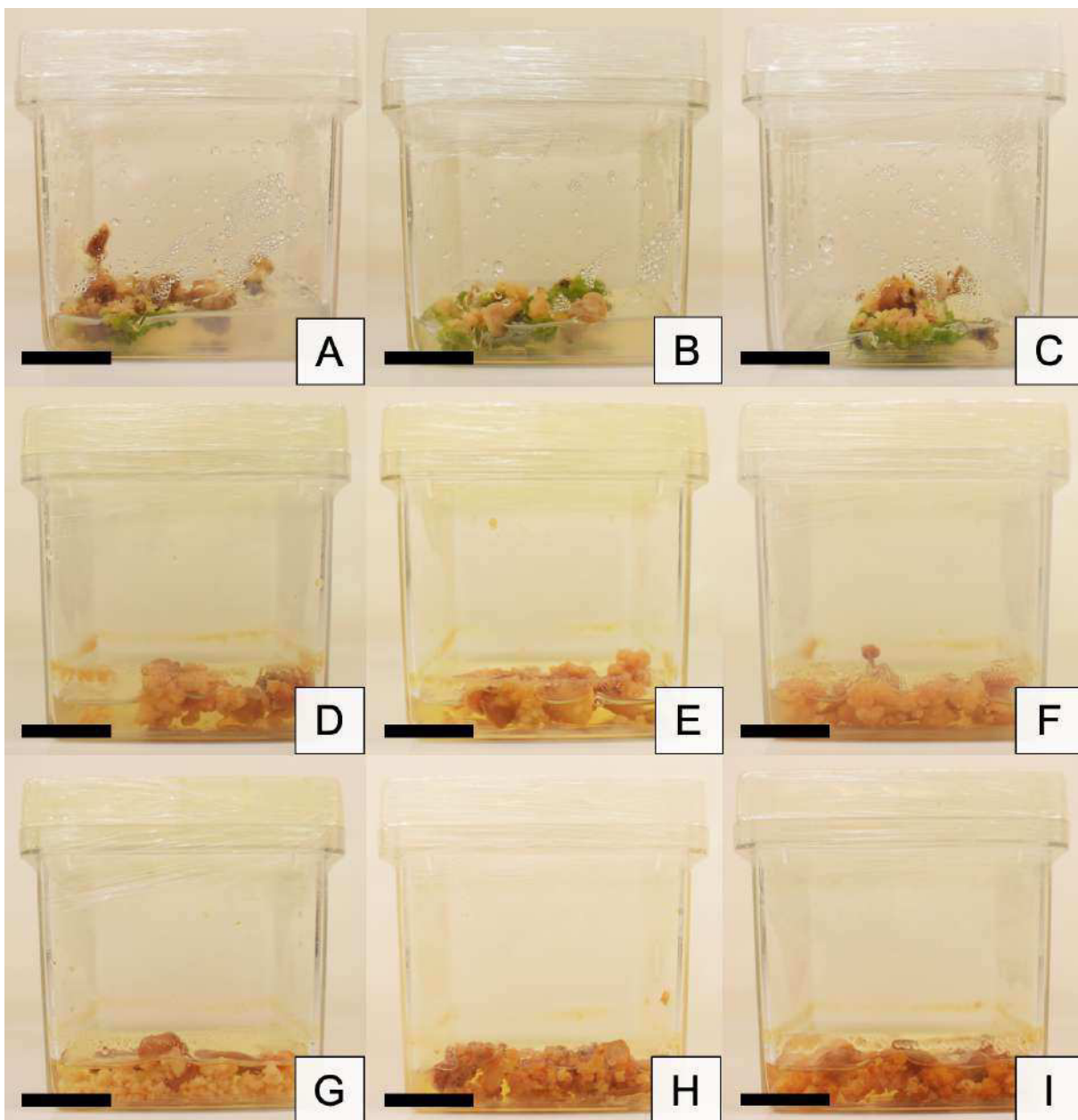


Figura 20. Inducción de callo embriogénico en *V. farnesiana*. A) Medio semisólido sin reguladores y fotoperiodo; B) $6.79 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio semisólido y fotoperiodo; C) $6.79 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio semisólido y oscuridad; D) Medio líquido sin reguladores y fotoperiodo; E) $2.26 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio líquido y fotoperiodo; F) $4.53 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio líquido y fotoperiodo; G) Medio líquido sin reguladores y oscuridad; H) $2.26 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio líquido y oscuridad; I) $4.53 \mu\text{M}$ 2,4-D, en medio líquido y oscuridad. Barras: 2.0 cm en A-I.

6.3 Maduración de Embriones Somáticos

Los tratamientos utilizados en la maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*, presentaron diversas respuestas dependiendo del suplemento utilizado. Primeramente, la coloración de los embriones fue variable, presentándose en tonalidades verde claro, amarillo, crema y marrón. También, en la mayoría de los tratamientos, se indujo embriogénesis somática secundaria, donde los callos embriogénicos comenzaron a formar embriones nuevamente. Otro punto por considerar es que toda la etapa de maduración sucedió de forma asíncrona, con las diferentes fases de embriones en los callos (Figuras 22-26).

Durante el primer mes evaluado, la adición de sacarosa al 5 % en el medio, permitió el mayor número de embriones totales (Cuadro 12; Figura 25C y D). No obstante, el mayor número de embriones cotiledonares y frecuencia de maduración se presentó con 6 % de PEG ($p \leq 0.05$) (Figura 26C y D), coincidiendo este último parámetro con 3 % de sacarosa (Cuadro 12; Figura 24C y D). Asimismo, en el segundo periodo de evaluación, la sacarosa al 5 % y 3 % PEG reportaron el mayor número de embriones somáticos; aunque el número de embriones cotiledonares se benefició con 3 % de sacarosa (Cuadro 13; Figuras 24C y D, 25C y D y 26A y B). La sacarosa a diferentes niveles puede inducir la maduración de embriones somáticos, principalmente por la alta osmolaridad que crea en el medio de cultivo, la cual mejora la tasa de maduración al prevenir la germinación precoz de los embriones (Pliego-Alfaro *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en la investigación utilizando sacarosa, coinciden con los reportados por Rajesh *et al.* (2014), en *Podophyllum hexandrum* y por Saeed and Shahzad (2015), con concentraciones de 20 a 60 g L⁻¹ en embriones somáticos de *Albizia lebbek*. Durante la etapa de maduración, los embriones experimentan diversos

cambios morfológicos y bioquímicos, que son evidentes por la deposición de proteínas de almacenamiento, la represión de germinación y la adquisición de tolerancia a la disociación (Jiménez, 2005). El PEG es considerado promotor de maduración de embriones somáticos en coníferas, ya que provee un bajo potencial osmótico en el medio. Esto sucede porque las moléculas más grandes de PEG no son capaces de atravesar la pared celular, lo que conduce a una reducción de turgencia y a un potencial de agua intracelular más negativo (Shoji *et al.*, 2006; George *et al.*, 2008). Dicho suplemento ha sido utilizado en la maduración de embriones somáticos de *Psidium guajava* (Rai *et al.*, 2009) y *Prosopis laevigata* (Buendía-González *et al.*, 2012).

Finalmente, con el uso de ABA en la primera evaluación, no se presentaron resultados prometedores en el número de embriones totales, cotiledonares y su frecuencia, incluso fueron superados por el tratamiento control (Cuadro 12; Figuras 22-24). Sin embargo, en el segundo mes evaluado la concentración de 3.78 μM de ABA, permitió la mayor frecuencia de maduración de los tratamientos evaluados ($p \leq 0.05$) (Cuadro 13; Figura 22C y D). El ABA mejora la maduración de los embriones somáticos y su calidad, aumentando la tolerancia a desecación e inhibiendo la germinación precoz (You *et al.*, 2011). Estos resultados coinciden con lo reportado por Cañedo-Ortiz *et al.* (2000), quienes, con concentraciones similares se benefició la maduración de embriones somáticos de *A. farnesiana* y *A. schaffneri*; y *Calliandra tweedii* (Heikrujam *et al.*, 2014).

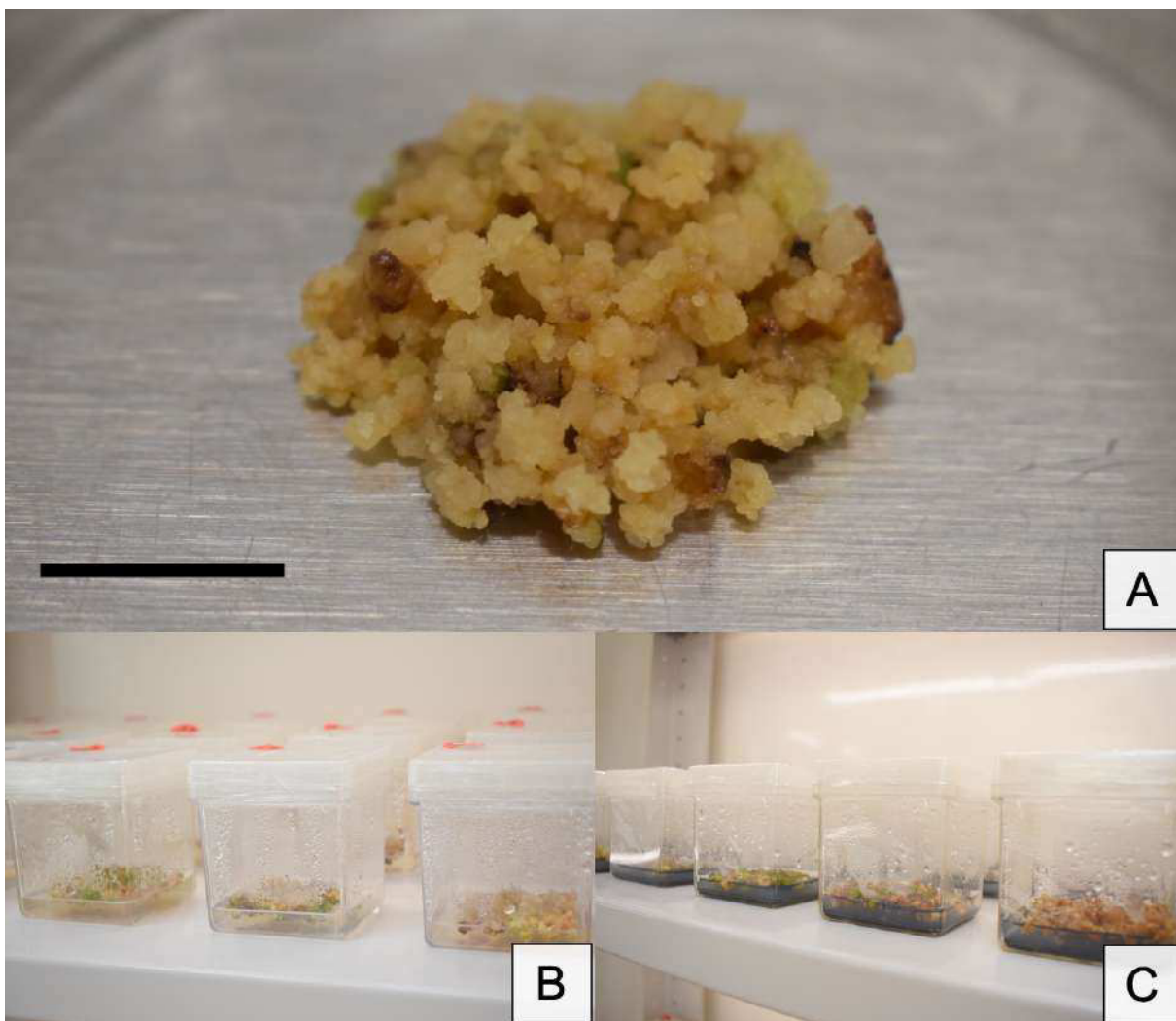


Figura 21. Etapas de proliferación y pre-maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*. A-B) Callos embriogénicos en medio de proliferación en fotoperiodo; C) Callos embriogénicos en medio de pre-maduración en fotoperiodo. Barra: 2.0 cm.

Cuadro 12. Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*, a cuatro semanas del subcultivo.

Tratamiento	Número de embriones somáticos		Frecuencia de maduración (%)
	Embriones totales	Embriones cotiledonares	
Control	27.6 ± 2.4 bcd	0.8 ± 0.3 ab	2.3 ± 0.8 ab
3.78 µM ABA	20.3 ± 1.9 de	0.02 ± 0.01 ab	0.1 ± 0.09 ab
7.57 µM ABA	11.9 ± 1.1 e	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
15.12 µM ABA	22.4 ± 2.1 de	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
30.24 µM ABA	23.2 ± 2.4 cd	0.1 ± 0.08 ab	0.3 ± 0.2 ab
3 % Sacarosa [‡]	37.2 ± 3.0 ab	1.1 ± 0.3 ab	2.7 ± 0.8 a
4 % Sacarosa [‡]	25.5 ± 2.8 cd	0.5 ± 0.3 ab	2.1 ± 1.4 ab
5 % Sacarosa [‡]	39.8 ± 2.4 a	1.0 ± 0.3 ab	2.2 ± 0.7 ab
3 % PEG	33.5 ± 2.4 abc	0.7 ± 0.2 ab	1.8 ± 0.6 ab
6 % PEG	27.6 ± 2.9 bcd	1.2 ± 0.4 a	2.6 ± 0.7 a

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % de macroelementos. [§]Medias más error estándar.

Cuadro 13. Efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*, a ocho semanas del subcultivo.

Tratamiento	Número de embriones somáticos		Frecuencia de maduración (%)
	Embriones totales	Embriones cotiledonares	
Control	38.9 ± 2.8 bc	1.2 ± 0.3 ab	2.3 ± 0.6 ab
3.78 µM ABA	33.1 ± 3.2 cd	1.8 ± 0.3 ab	4.8 ± 0.8 a
7.57 µM ABA	19.9 ± 2.9 d	0.6 ± 0.2 b	1.2 ± 0.4 b
15.12 µM ABA	39.6 ± 3.8 abc	1.1 ± 0.3 ab	2.3 ± 0.5 ab
30.24 µM ABA	31.9 ± 3.0 cd	0.6 ± 0.1 b	1.6 ± 0.4 b
3 % Sacarosa [‡]	47.6 ± 3.1 ab	2.0 ± 0.4 a	3.7 ± 0.7 ab
4 % Sacarosa [‡]	32.5 ± 3.1 cd	0.9 ± 0.4 b	2.6 ± 1.1 ab
5 % Sacarosa [‡]	53.5 ± 2.5 a	1.9 ± 0.4 ab	3.0 ± 0.6 ab
3 % PEG	53.9 ± 3.3 a	1.5 ± 0.3 ab	2.7 ± 0.5 ab
6 % PEG	38.4 ± 3.6 bc	1.9 ± 0.4 ab	3.7 ± 0.7 ab

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % de macroelementos. [§]Medias más error estándar.

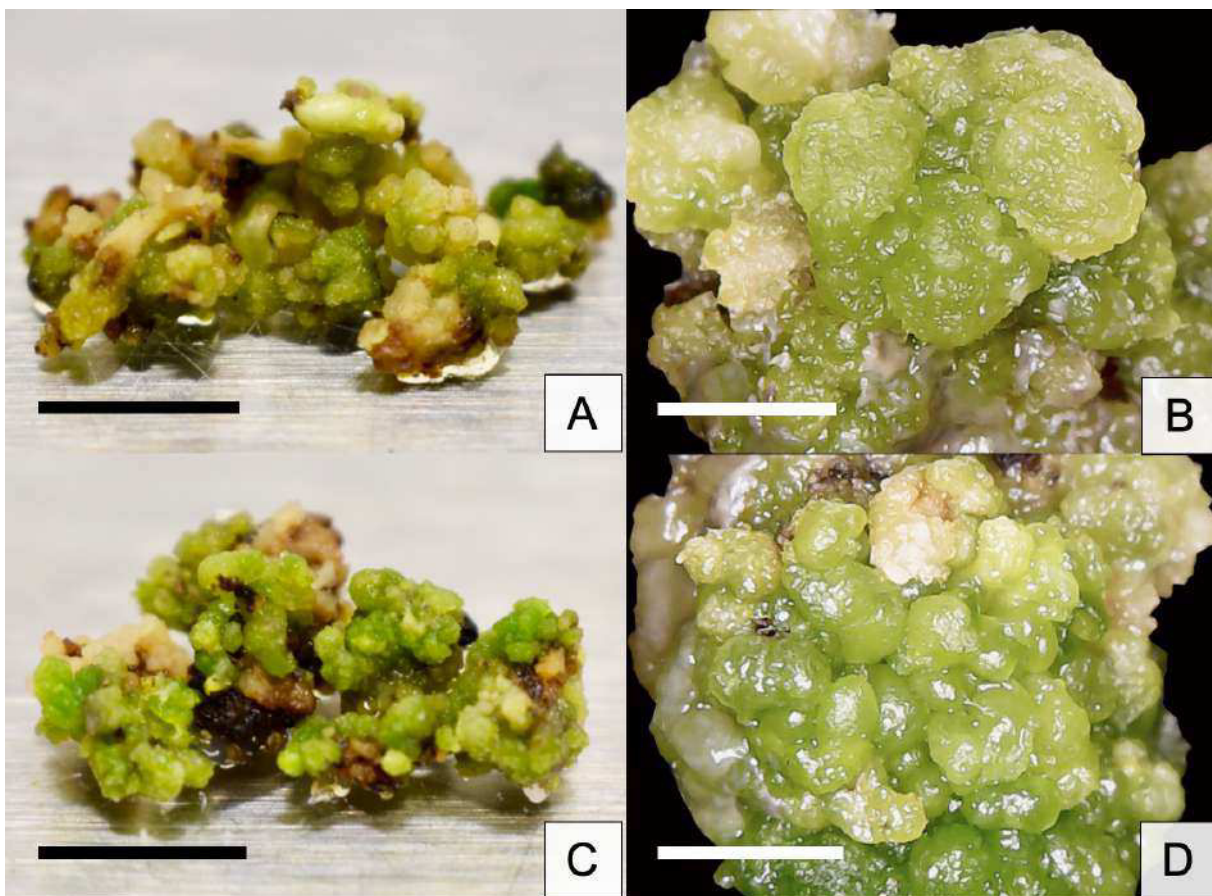


Figura 22. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *V. farnesiana*. A-B) Embriones globulares, corazón y torpedo en medio sin reguladores; C-D) Embriones globulares y corazón en 3.78 μM de ABA. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

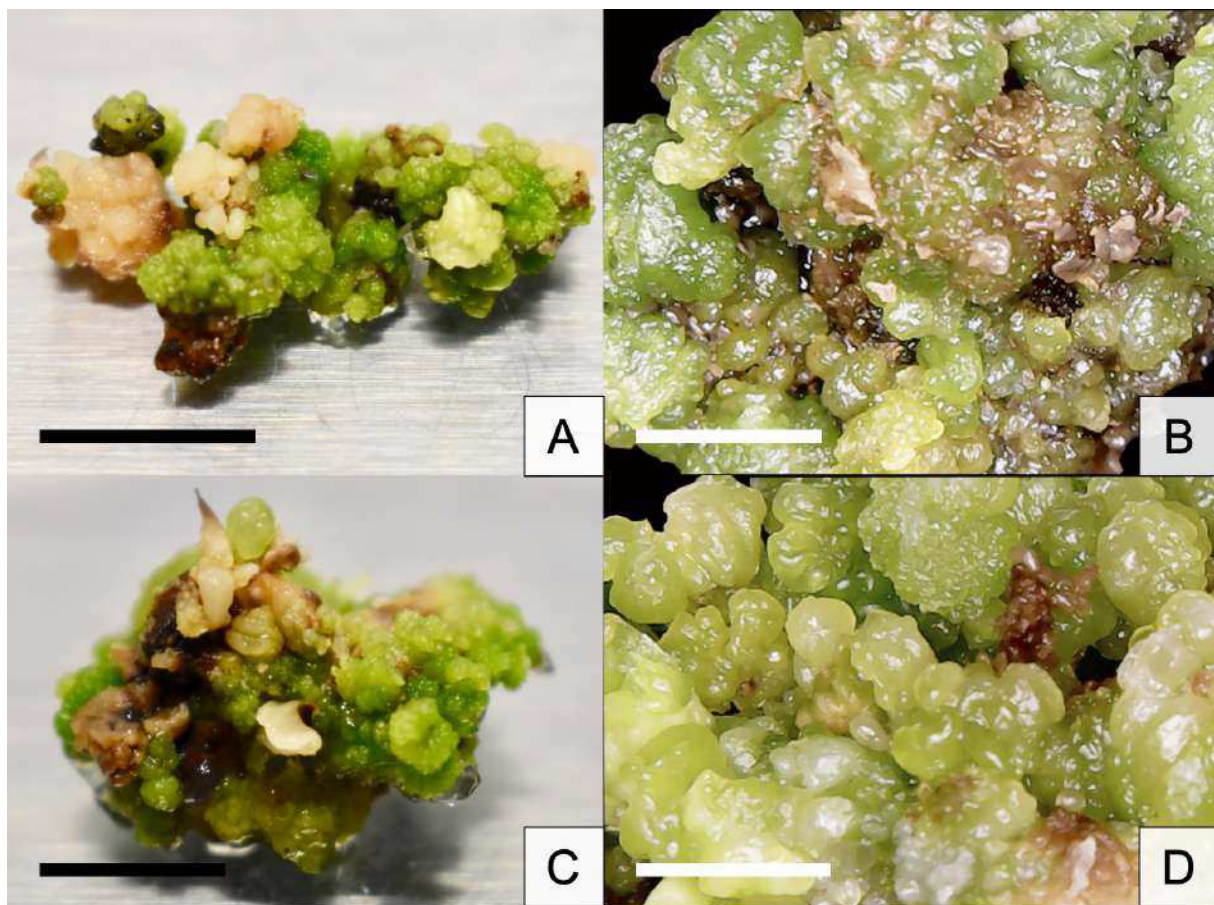


Figura 23. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *V. farnesiana*. A-B) Embriones globulares y corazón en 7.57 μM de ABA; C) Embriones globulares y torpedo en 15.12 μM de ABA; D) Embriogénesis somática secundaria en 15.12 μM de ABA. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

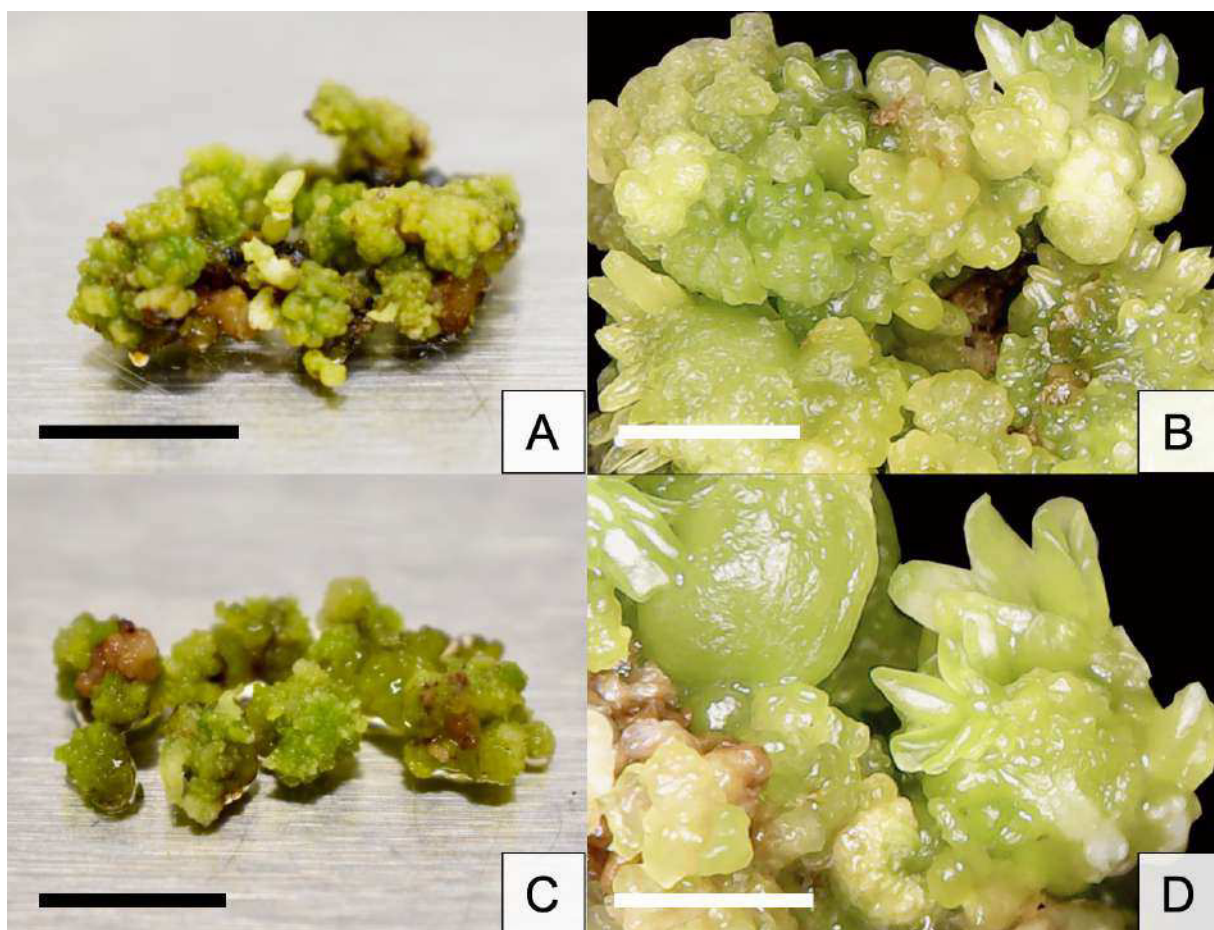


Figura 24. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *V. farnesiana*. A) Embriones globulares y torpedo en 30.24 μM de ABA; B) Embriogénesis somática secundaria con embriones globulares, corazón y torpedo en 30.24 μM de ABA; C-D) Embriones globulares y cotiledonares con 3 % de sacarosa. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

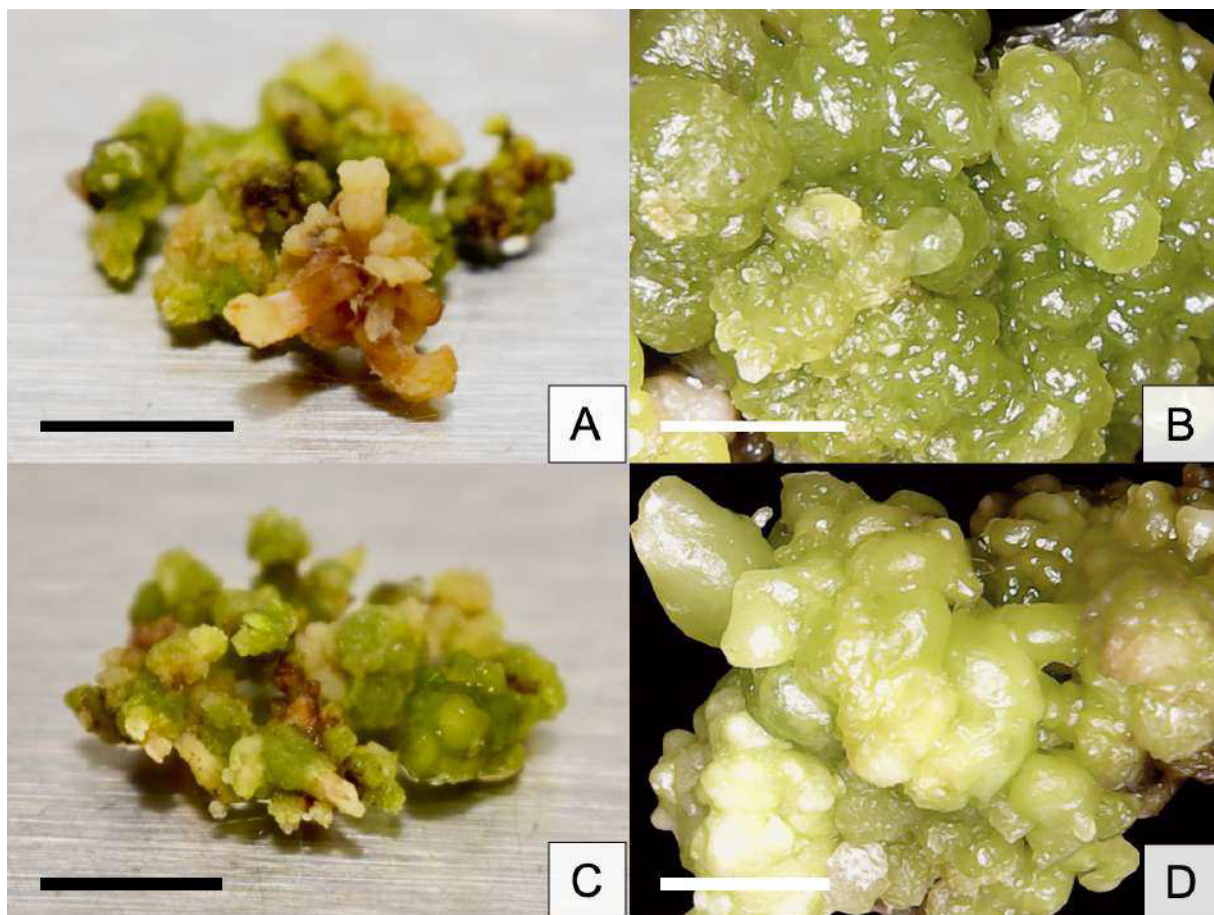


Figura 25. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *V. farnesiana*. A) Embriones torpedo y; B) Embriones globulares y corazón con 4 % de sacarosa; C) Embriones torpedo y; D) Embriones globulares y corazón con 5 % de sacarosa. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

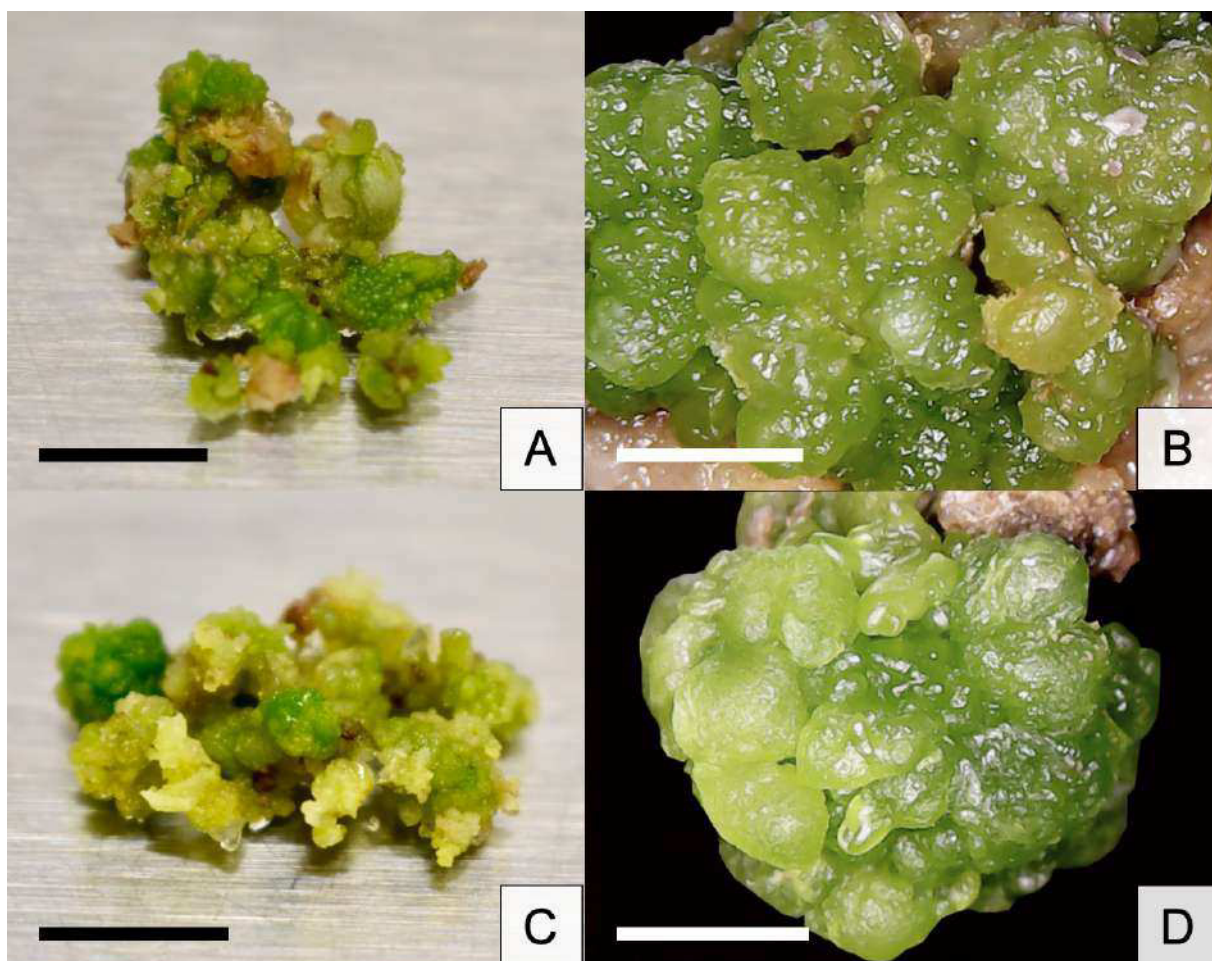


Figura 26. Efecto de los suplementos en la etapa de maduración en callos embriogénicos de *V. farnesiana*. A) Embriones torpedo, cotiledonares y; B) Embriones globulares con 3 % de PEG; C-D) Embriones globulares y corazón con 6 % de PEG. Barras: 1.0 cm en A y C; 5 mm en B y D.

6.4 Contenido de Humedad en Embriones Somáticos

Las mediciones de peso fresco en *V. farnesiana* no presentaron diferencias entre tratamientos ($p \leq 0.05$), sin embargo, el tratamiento control destaca con la mayor cantidad de masa (Cuadro 14). En cuanto al peso seco, los mayores valores se registran en los tratamientos suplementados con PEG, mientras que los tratamientos con los menores pesos secos son los suplementados con las concentraciones de

sacarosa (Cuadro 14). En cambio, el contenido de humedad presentó los menores porcentajes cuando los medios se suplementaban con 3 o 6 % de PEG; mientras que el control presentó el mayor contenido de humedad (Cuadro 14). En el proceso de maduración de semillas, el aumento de las reservas de alimento, desplazan el agua interna, generando un aumento en el peso seco, a medida que el contenido de humedad disminuye. Es por esta situación, que los parámetros de peso fresco y seco y contenido de humedad pueden ser útiles para determinar la edad fisiológica de las semillas y el desarrollo de embriones somáticos (Prewain *et al.*, 2006). Con base en esto, se demuestra que el uso de PEG 4000 en *V. farnesiana* es favorable para inducir la maduración de los embriones somáticos (Figura 27), ya que a medida que disminuye el contenido de humedad, el peso seco aumenta, en este caso por el aumento de concentración del PEG.

Cuadro 14. Variación en el contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de la etapa de maduración de *V. farnesiana*.

Tratamiento	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Humedad (%)
Control	1.29 ± 0.07 a	0.07 ± 0.005 bc	94.1 ± 0.2 a
3.78 µM ABA	1.08 ± 0.1 a	0.08 ± 0.005 bc	92.1 ± 0.3 bcd
7.57 µM ABA	0.85 ± 0.1 a	0.08 ± 0.009 bc	89.7 ± 0.3 e
15.12 µM ABA	1.15 ± 0.1 a	0.09 ± 0.006 bc	91.6 ± 0.5 cd
30.24 µM ABA	0.99 ± 0.1 a	0.09 ± 0.01 bc	90.8 ± 0.3 de
3% Sacarosa [‡]	1.03 ± 0.1 a	0.06 ± 0.006 c	93.5 ± 0.2 ab
4% Sacarosa [‡]	0.94 ± 0.08 a	0.06 ± 0.006 c	92.8 ± 0.2 abc
5% Sacarosa [‡]	1.09 ± 0.06 a	0.07 ± 0.005 bc	92.7 ± 0.3 abc
3% PEG	1.05 ± 0.08 a	0.11 ± 0.01 ab	89.3 ± 0.4 e
6% PEG	0.92 ± 0.1 a	0.13 ± 0.01 a	85.1 ± 0.3 f

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % de macroelementos. [§]Medias más error estándar.

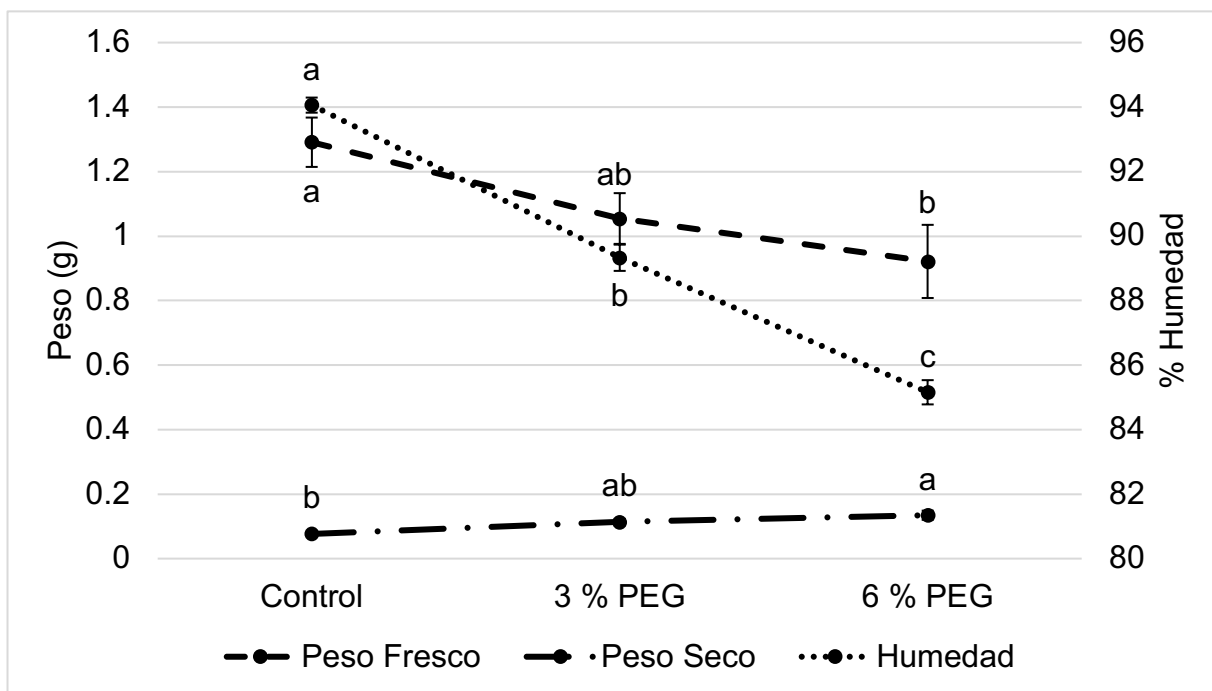


Figura 27. Efecto de las concentraciones de PEG en la maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*, en relación con el peso fresco, peso seco y contenido de humedad. †Se realizaron ocho mediciones por tratamiento. ‡Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$). §Las barras verticales indican el error estándar.

6.5 Histología

Los estudios histológicos de los callos embriogénicos confirmaron que los embriones somáticos desarrollados, siguen un modelo normal de desarrollo del embrión. Su diferenciación surgió a partir de células epidérmicas y subepidérmicas, de los callos primarios. Además, se identificaron células meristemáticas en los sitios de origen de los embriones, las cuales fueron de tamaño menor y núcleos bien formados (Figura 28). En el tratamiento control, se observaron estructuras proembriogénicas con protodermis en progreso, surgiendo de una zona no embriogénica (Figura 28A). Mientras que con $15.12 \mu\text{M}$ ABA, se diferenciaron claramente embriones globulares

que ya no presentan conexión vascular con el tejido principal (Figura 28B). Con el uso de 5 % de sacarosa, no se observaron estructuras embriogénicas, sin embargo, se pudo apreciar claramente las zonas no embriogénicas (Figura 28C), donde de acuerdo con Carvalho *et al.* (2013), presentan células desorganizadas y de diversas formas, así como vacuolas que cubren toda la célula. Finalmente, con 6 % de PEG, se observaron embriones somáticos de fase corazón y torpedo, los cuales estaban fusionados, no obstante, presentaban una protodermis desarrollada y células meristemáticas en división (Figura 28D). Estos efectos son afines a lo indicado en *A. mangium* (Xie and Hong, 2001) y *A. lebbeck* (Saeed and Shahzad, 2015).

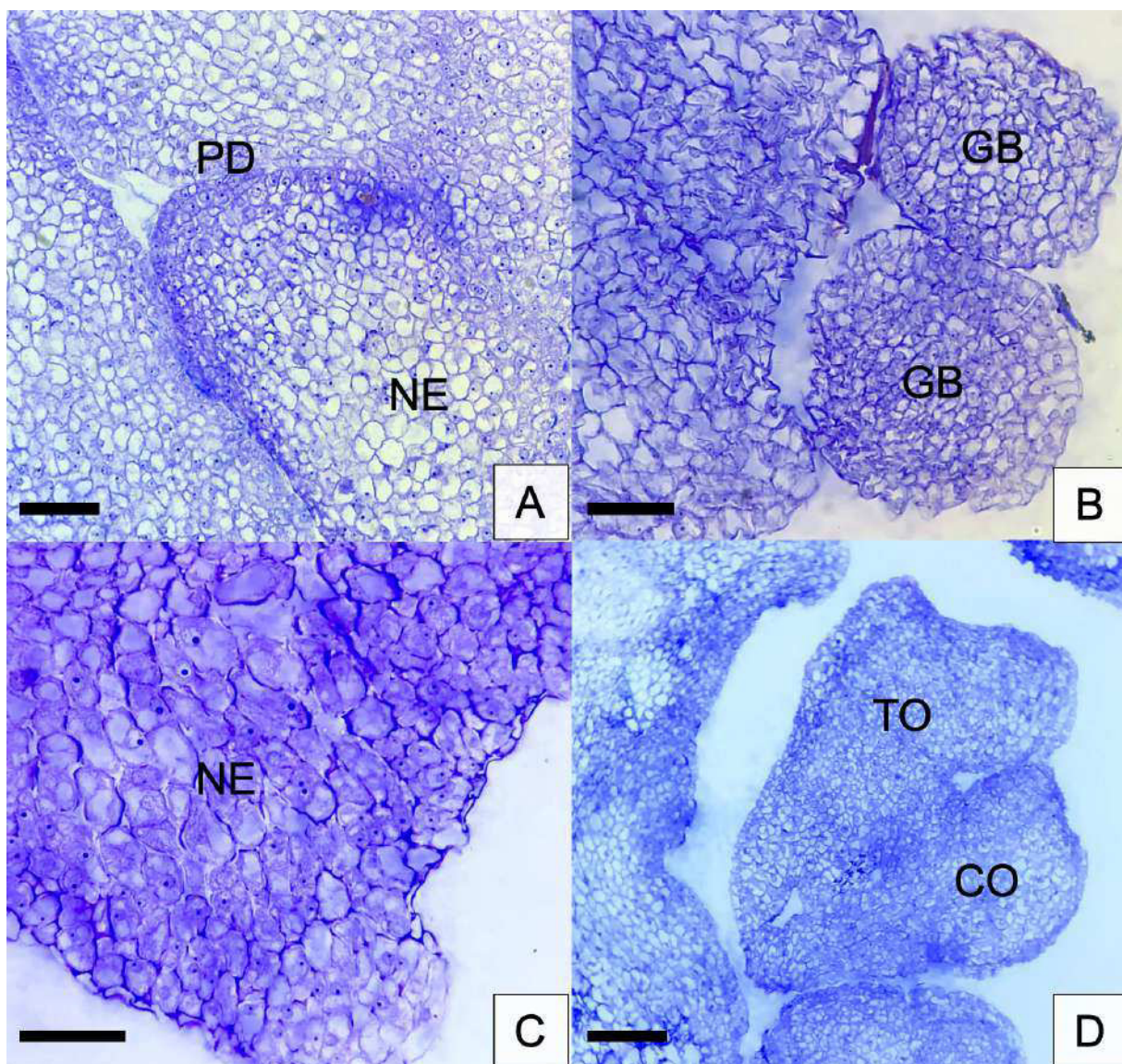


Figura 28. Cortes histológicos de callos embriogénicos de *V. farnesiana* en la etapa de maduración. A) Efecto del tratamiento sin reguladores con la formación de estructuras proembriogénicas, a partir de tejido no embriogénico (NE) y protodermis en desarrollo (PD); B) Embriones globulares (GB) en 15.12 μM de ABA, separados de una zona no embriogénica; C) Aspecto de tejido no embriogénico en 5 % de sacarosa; D) Efecto del 6 % de PEG en embriones tipo corazón (CO) y torpedo (TO). Barras: 50 μm en A-C; 100 μm en D.

6.6 Germinación de Embriones Somáticos

Los embriones de fase torpedo y cotiledonar con cuatro y ocho semanas de madurez, transferidos a los tratamientos de germinación, mostraron diferentes respuestas (Figuras 29 y 30). No se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), con embriones somáticos de cuatro semanas de maduración, con porcentajes de germinación menores al 45 % (Cuadro 15). Algunas unidades experimentales presentaron grupos de embriones en fase torpedo y cotiledonar sin inducción de radícula (Figura 29B y C); aunque con 2.22 μM BAP y 2.89 μM AG₃, se estimuló la formación de la radícula (Figura 29A y D). En cambio, los embriones de ocho semanas de maduración presentaron valores de germinación superiores al 50 % ($p \leq 0.05$), destacando los tratamientos con 1.45 y 2.89 μM de AG₃ (Cuadro 15; Figura 30B y D), presentando en ambos casos, grupos de embriones cotiledonares con formación de radícula. De la misma forma, en el tratamiento control la presencia y extensión de la radícula fue mayor que con AG₃, sin embargo, los embriones permanecieron fusionados (Figura 30A). Estos resultados coinciden con lo reportando en embriones somáticos maduros de *A. farnesiana* y *A. schaffneri* (Cañedo-Ortiz *et al.*, 2000), *A. mangium* (Xie and Hong, 2001) y *A. senegal* (Rathore *et al.*, 2012), utilizando BAP y AG₃ como promotores de germinación.

Cuadro 15. Efecto de los reguladores BAP y AG₃ a cuatro semanas del subcultivo, en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de *V. farnesiana*, de cuatro y ocho semanas de maduración.

Tratamiento	Germinación (%)	
	Embriones 1 mes	Embriones 2 meses
Control [†]	36.8 ± 3.6 a	39.4 ± 3.7 ab
2.22 µM BAP [‡]	42.1 ± 4.9 a	40.2 ± 5.5 ab
4.44 µM BAP [‡]	31.2 ± 5.0 a	30.4 ± 4.01 b
1.45 µM AG ₃ [‡]	31.9 ± 3.2 a	49.4 ± 2.6 a
2.89 µM AG ₃ [‡]	35.4 ± 3.6 a	53.6 ± 4.2 a
2.22 + 1.45 µM (BAP/AG ₃) [‡]	25.8 ± 2.6 a	27.8 ± 3.8 b

[†]Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

[‡]Medio MS al 50 % + 2.68 µM ANA. [§]Medias más error estándar.



Figura 29. Efecto de BAP y AG₃ en la germinación de embriones somáticos de *V. farnesiana* de un mes de maduración. A) Embriones cotiledonares con formación radícula y callo no embriogénico con 2.22 μ M BAP; B) Grupo de embriones torpedo fusionados con 4.44 μ M BAP; C) Grupos de embriones torpedo y cotiledonares fusionados con formación de radícula en 1.45 μ M AG₃; D) Embrión cotiledonar con radícula y formación de callo no embriogénico con 2.89 μ M AG₃. Barras: 1.0 cm en A-D.

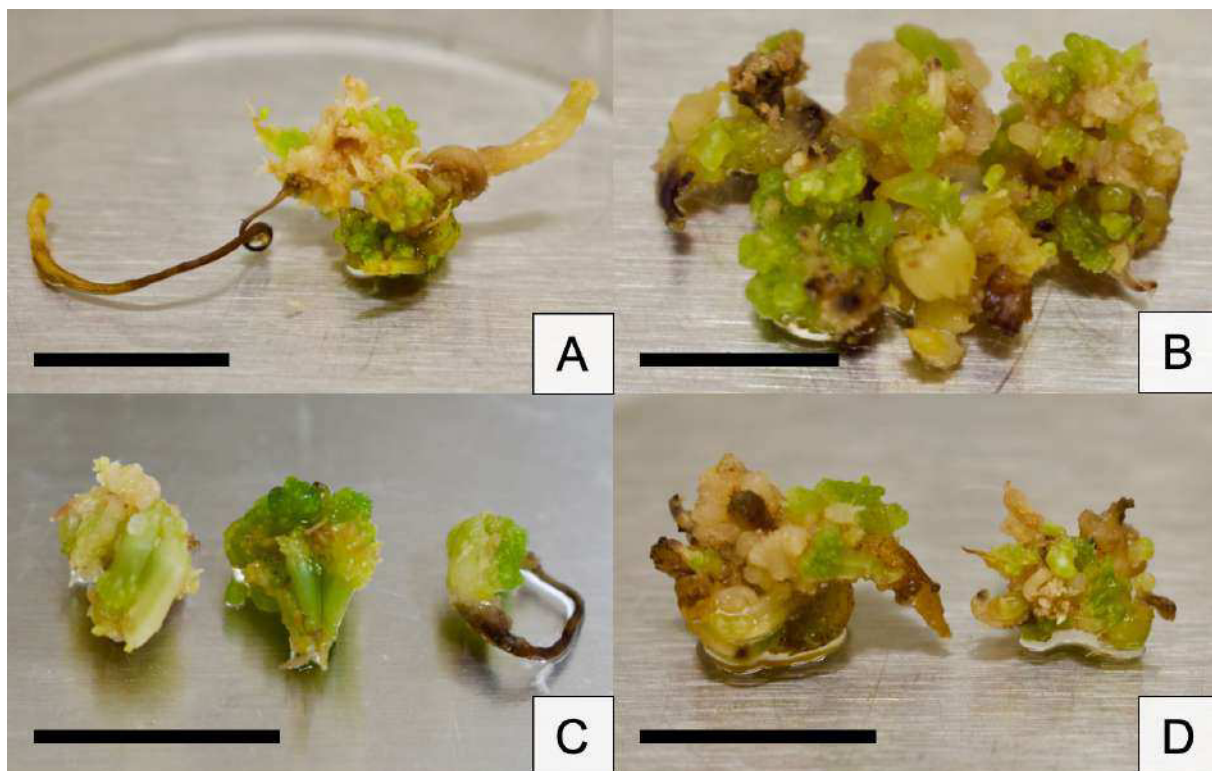


Figura 30. Efecto de BAP y AG₃ en la germinación de embriones somáticos de *V. farnesiana* de dos meses de maduración. A) Grupo de embriones cotiledonares con formación de radícula en medio sin reguladores; B) Grupo de embriones torpedo fusionados con formación de callo no embriogénico con 1.45 μM AG₃; C) Embriones torpedo y cotiledonares fusionados con formación de radícula en 2.22 μM BAP; D) Grupo de embriones torpedo y cotiledonares con radícula y callo no embriogénico con 2.89 μM AG₃. Barras: 1.0 cm en A-D.

7. CONCLUSIONES

1. En la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *V. farnesiana*, el medio de cultivo MS demostró los menores valores de contaminación y oscurecimiento, permitiendo su viabilidad.
2. En la etapa de inducción, los explantes de *V. farnesiana* desarrollan callo embriogénico con los parámetros de 4.53 μM de 2,4-D, en medio líquido y bajo condiciones de oscuridad total.
3. La etapa de maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana* depende del efecto de los suplementos en el medio de cultivo, donde las concentraciones de 5 % de sacarosa y 3 % de PEG, promueven el mayor número de embriones totales.
4. Las medidas de peso fresco y seco y contenido de humedad en callos embriogénicos de *V. farnesiana*, pueden determinar el nivel de madurez, demostrando que el PEG permite obtener embriones maduros de calidad.
5. Los cortes histológicos comprueban el origen y modelo de crecimiento de los embriones somáticos de *V. farnesiana*.
6. En la etapa de germinación, las concentraciones de AG₃ a 1.45 y 2.89 μM son efectivas para iniciar el desarrollo de embriones somáticos maduros de *V. farnesiana*, de ocho semanas de madurez.

8. RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el transcurso de esta investigación, se indican las siguientes sugerencias:

1. Con la finalidad de reducir el oscurecimiento de los explantes y medio de cultivo, es primordial la eliminación total de la testa de las semillas inmaduras.
2. Es recomendable reducir la etapa de inducción de callo embriogénico en medios líquidos a máximo tres semanas, ya que su prolongación provoca el deterioro de los callos.
3. Los subcultivos de la etapa de proliferación pueden ampliarse a tres o cuatro semanas, para evitar el oscurecimiento de los callos.
4. Se sugiere agregar algún antioxidante como PVP o ácido ascórbico a los medios de inducción y proliferación, para reducir el oscurecimiento de los callos.
5. La etapa de pre-maduración podría ampliarse a cuatro semanas, para contrarrestar el oscurecimiento de las etapas de inducción y proliferación.
6. Las concentraciones de PEG pueden aumentarse hasta 9 % o probar el efecto de PEG de mayor peso molecular como 8000 o 12,000, en la etapa de maduración de embriones somáticos.
7. Se pueden utilizar diferentes tipos de citocinina, en diferentes concentraciones y combinaciones, para estimular el desarrollo de los cotiledones, en los embriones maduros.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Bhojwani, S. S. and P. K. Dantu. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India. 309 p.
- Briones, O. L. y J. A. Villarreal. 2001. Vegetación y flora de un ecotono entre las provincias del Altiplano y de la Planicie Costera del Noreste de México. Acta Botánica Mexicana 55:36-67.
- Buendía-González, L., M. E. Estrada-Zúñiga, J. Orozco-Villafuerte, F. Cruz-Sosa and E. J. Vernon-Carter. 2012. Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 108:287-296.
- Cañedo-Ortiz, B. O., M. E. Pérez-Reyes and E. Pérez-Molphe-Balch. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A. schaffneri*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 36:268-272.
- Carvalho, M. A. F., R. Paiva, E. Alves, R. C. Nogueira, V. C. Stein. E. M. de Castro, P. D. O. Paiva and D. P. Vargas. 2013. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. Braz. J. Bot. 36:141-151.
- Cervantes, V., J. Carabias and C. V. Yanes. 1996. Seed germination of woody legumes from deciduous tropical forest of southern Mexico. Forest Ecol. & Manage 82:171-184.
- Correll, D. S. and M. C. Johnston. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Volume 6. Texas Research Foundation. Renner. Texas, USA. pp. 761-794.

- De Filippis, L. F. 2014. Crop improvement through tissue culture. In: Ahmad P., M. R. Wani, M. M. Azooz and L. S. P. Tran (eds.). Improvement of crops in the era of climatic changes. Springer New York. pp. 289-346.
- Dhawan, V. 1993. Micropropagation of N-fixing trees. In: Ahuja, M. R. (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Forestry Sciences 41. Springer Dordrecht. pp. 303-315.
- Egertsdotter, U. 1998. Somatic embryogenesis in *Picea* suspension cultures. In: Hall, R. (ed.). Plant Cell Culture Protocols. Humana Press. Louisville, KY, USA.
- Estrada, C. A. y J. Marroquín de la Fuente. 1992. Leguminosas del Centro-Sur de Nuevo León. Reporte Científico, 10. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México. 258 p.
- Gamborg, O., R. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- Gantait, S., S. Kundu and P. K. Das. 2018. *Acacia*: An exclusive survey on *in vitro* propagation. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 17:163-177.
- Gantait, S., U. R. Sinniah and P. K. Das. 2014. *Aloe vera*: a review update on advancement of *in vitro* culture. Acta Agric. Scand., Sect. B – Soil Plant Sci. 6:1-12.
- García, S., G. Alarcón, C. Rodríguez and N. Heredia. 2006. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 22:669-674.

- Garg, L., N. N. Bhandari, V. Rani and S. S. Bhojwani. 1996. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. Plant Cell Reports 15:855-858.
- George, E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. Plant propagation by Tissue Culture, 3rd ed. Volume 1. The Background. Springer, Netherlands. 501 p.
- Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107:161-170
- Gupta, P. K. and D. J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4: 177-179.
- Heikrujam, M., D. Kumar, S. Kumar, S. C. Gupta and V. Agrawal. 2014. High efficiency cyclic production of secondary somatic embryos and ISSR based assessment of genetic fidelity among the emblings in *Calliandra tweedii* (Benth.). Scientia Horticulturae 177:63-70.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry. Principles and Practice. Freeman W. H. & Co. San Francisco, California, USA. pp. 71-91.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regul. 47:91-110.
- Lloyd, G. B. and B. H. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Com. Proc. 30: 421-427.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15:473-497.

- Nanda, R. M. and G. R. Rout. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73:131-135.
- Niembro-Rocas, A. 1986. Árboles y arbustos útiles de México. Editorial LIMUSA, México, D.F. pp. 26-28.
- New South Wales Flora. 2010. Disponible en: <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/floraonline.htm>
- Paiva, J. 1999. Acacia. In: Talavera, S., C. Aedo, S. Castroviejo, Z. Romero, C. Sáez, L. Slagueiro and F. J. Velayos. (eds.). Flora Ibérica – Plantas Vasculares de la Península Ibérica Islas Baleares. Vol. VII (1). Leguminosae. Real Jardín Botánico, CSIS, Madrid, España. pp. 11-25.
- Palmberg, C. 1981. A vital fuel wood gene pool is in danger. Unasyuva 133:22-30.
- Pérez, M., M. Viejo, M. LaCuesta, P. Toorop and M. J. Cañal. 2015. Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus suber* L. somatic embryos. Journal of Plant Physiology 173:51-61.
- Pliego-Alfaro, F., M. J. R. Monsalud, R. E. Litz, D. J. Gray and P. A. Moon. 1996. Effect of abscisic acid, osmolarity and partial desiccation on the development of recalcitrant mango somatic embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44:63-70.
- Prewin, C., M. Endemann, V. Reinohl, J. Salaj, V. Sunderlikova and E. Wilhem. 2006. Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. Trees Struct Funct 20:53-60.
- Quoirin, M. 2003. Micropropagation of *Acacia* species. In: Jain, S. M. and K. Ishii (eds.). Micropropagation of Woody Trees and Fruits. pp. 245-268.

- Rai, M. K., V. S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 121:233-236.
- Rajesh, M., G. Sivanandhan, K. Subramanyam, G. Kapildev, B. Jaganath, S. Kasthuriangan, M. Manickavasagam and A. Ganapathi. 2014. Establishment of somatic embryogenesis and podophyllotoxin production in liquid shake cultures of *Podophyllum hexadrum* Royle. *Industrial Crops and Products* 60:66-74.
- Rathore, J. S., M. K. Rai and N. S. Shekhawat. 2012. Induction of somatic embryogenesis in gum Arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd.]. *Physiol Mol Biol Plants* 18(4):387-392.
- Rout, G. R., S. Samantaray and P. Das. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* – a multipurpose leguminous tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42:283-285.
- Saeed, T. and A. Shahzad. 2015. High frequency plant regeneration in Indian Siris via cyclic somatic embryogenesis with biochemical, histological and SEM investigations. *Industrial Crops and Products* 76:623-637.
- Santi-Gadelha, T., B. A. M. Rocha, C. A. A. Gadelha, H. C. Silva, R. E. R. Castellon, F. J. T. Gonçalves, D. O. Toyama, M. H. Toyama, A. J. F. de Souza, L. O. S. Beriam, J. L. Martins, P. P. Joazeiro, B. S. Cavada. 2012. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103:15-22.

- Shoji, M., H. Sato, R. Nakagawa, R. Funada, T. Kubo and S. Ogita. 2006. Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. *Journal of Forest Research* 11:449-453.
- Simmons, M. H. 1987. The genus *Acacia*. In: Simmons, M. H. (ed.). *Acacias of Australia*, Vol. 1. Nelson, South Melbourne, Australia. pp. 7-10.
- Skolmen, R. G. 1986. *Acacia (Acacia koa Gray)*. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 45. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 375-383.
- Tame, T. 1992. *Acacias of Southeast Australia*. Kangaroo Press. Pty. Ltd. Australia. 206 p.
- Xie, D. Y. and Y. Hong. 2001. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 20:34-40.
- Vengadesan, G., A. Ganapathi, V. R. Anbazhagan and R. P. Anand. 2002. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38:52-57.
- You, C. R., T. J. Fan, X. Q. Gong, F. H. Bian, L. K. Liang and F. N. Qu. 2011. A high-frequency cyclic secondary embryogenesis system for the *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 107: 233-242.

CAPÍTULO 4. INDUCCIÓN DE CALLO *in vitro* EN MEZQUITE (*Prosopis glandulosa* TORR.)

1. RESUMEN

El mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), es una fabácea leñosa multipropósito originaria de América. Sus usos destacan en la obtención de leña, carbón, madera, forrajes y permite la fijación de nitrógeno en el suelo. Además, se ha utilizado para obtener gomas, medicamentos y tiene potencial como antidiabético, cardioprotector y para la producción de biocombustibles. Esta especie se propaga tradicionalmente por semilla, sin embargo, debido a la presencia de tegumentos requiere de escarificación. Además, la hibridación entre especies es alta. Por esta razón, es importante desarrollar métodos alternos para su propagación clonal efectiva. El cultivo de tejidos vegetales permite obtener un gran número de ejemplares en un tiempo reducido, bajo condiciones controladas y un medio de cultivo artificial. Las células vegetales bajo ciertas condiciones cultivo pueden originar una masa desordenada conocida como callo, que posteriormente puede originar plántulas completas clonares. Con base en este contexto, en la presente investigación se implementó un protocolo para la inducción de callo en semillas inmaduras de *P. glandulosa*. Estas semillas se desinfectaron en condiciones asépticas para después sembrarse en tres medios de cultivo. La viabilidad total se obtuvo en las semillas y algunas iniciaron el proceso de callogénesis. Posteriormente, se inicio la etapa de inducción donde los explantes se transfirieron a medio MS adicionado con ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) (2.26-

6.79 μM) combinado con 6-bencilaminopurina (BAP) (2.22-6.66 μM), en condiciones de fotoperiodo. Concluida la evaluación, los explantes presentaron la mayor formación de callo con 6.79/6.66 μM 2,4-D/BAP. Finalmente, los callos se subcultivaron cada dos semanas a medio de proliferación utilizando medio MS con dosis bajas de 2,4-D y BAP, completando 12 semanas. En estas condiciones, los callos continuaron proliferando y algunos presentaron oscurecimiento, inducción de brotes y/o callo embriogénico.

2. ABSTRACT

Honey mesquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), is a multipurpose woody fabaceous native to America. Its uses stand out in the obtaining of firewood, coal, wood, fodder and allows the fixation of nitrogen in the soil. In addition, it has been used to obtain gums, medicines and has potential as an antidiabetic, cardioprotective and for the production of biofuels. This species is propagated traditionally by seed, however, due to the presence of teguments requires scarification. In addition, hybridization between species is high. For this reason, it is important to develop alternative methods for its effective clonal propagation. The cultivation of plant tissues allows obtaining a large number of specimens in a short time, under controlled conditions and an artificial culture medium. Plant cells under certain culture conditions can originate a disordered mass known as callus, which can later cause complete cloning seedlings. Based on this context, in the present investigation a protocol was implemented for the induction of callus in immature seeds of *P. glandulosa*. These seeds were disinfected in aseptic conditions and then sown in three culture media. The total viability was obtained in the seeds and some started the process of callogenesis. Subsequently, the induction stage was started where the explants were transferred to MS medium added with 2,4-diclofenoxiacetic acid (2,4-D) (2.26-6.79 μM) combined with 6-benzylaminopurine (BAP) (2.22-6.66 μM), under photoperiod conditions. After the evaluation, the explants showed the highest callus formation with 6.79 / 6.66 μM 2,4-D / BAP. Finally, calluses were subcultured every two weeks to proliferation medium using MS medium

with low doses of 2,4-D and BAP, completing 12 weeks. Under these conditions, the calluses continued to proliferate and some presented darkening, shoot induction and / or embryogenic callus.

3. INTRODUCCIÓN

El cambio de uso de suelo para tipo agrícola, urbano e industrial ha provocado un descenso en el área total de zonas naturales en el mundo (FAO, 2010). En México, en la última década, el matorral xerófilo presentó la mayor pérdida en superficie, debido a la extensión que cubre este tipo de vegetación en el país (FAO y CONAFOR, 2011; Ngangyo Heya *et al.*, 2017). Este ecosistema se distribuye en el noreste del país (Foroughbakhch *et al.*, 2009); donde el 25% de la deforestación total en México está concentrada en esta área (Céspedes-Flores y Moreno-Sánchez, 2010). Este tipo de vegetación está compuesto de alrededor de 60 especies leñosas, muchas de las cuales son importantes para la producción forestal y silvopastoril (Foroughbakhch *et al.*, 2006; 2009); destacando los géneros *Acacia*, *Prosopis*, *Ebenopsis*, *Caesalpinia* y *Havardia* (Estrada y Marroquín de la Fuente, 1992).

El género *Prosopis* (Fabaceae) reúne alrededor de 50 especies, de las cuales 42 son nativas del continente americano (Arce and Medina, 1997; Andrade-Montemayor *et al.*, 2011; Henciya *et al.*, 2017). El mezquite (*P. glandulosa* Torr.), es una especie leñosa que se distribuye desde el sur de Texas, hasta el sureste de México (Martin and Alexander, 1974). Es tolerante a condiciones de sequía y permite la fijación de nitrógeno en el suelo (Golubov *et al.*, 2001; Chaires-Martínez *et al.*, 2008). Tiene múltiples usos, entre ellos la obtención de leña, carbón, madera, cortezas, forraje, gomas, consumo humano y para la fabricación de medicamentos (Arce and Medina, 1997; Bhansali, 2010). Recientemente, se ha observado su potencial como tratamiento

antidiabético (George *et al.*, 2011); como fuente natural de antioxidantes y cardioprotector (García-Andrade *et al.*, 2013); para la obtención de galactomananos (Martínez-Ávila *et al.*, 2014); así como para la producción de biocombustibles (Park *et al.*, 2012).

Esta especie se propaga por semilla, sin embargo, requiere procedimientos de escarificación (Arce and Medina, 1997), debido a la presencia de tegumentos impermeables (Rodríguez-Araujo *et al.*, 2017). No obstante, desde que la hibridación natural ocurre entre especies, el uso de semillas no es recomendable (Bhansali, 2010); por tanto, es necesario buscar alternativas eficientes, que permitan aumentar la tasa de regeneración clonal de esta especie. El cultivo de tejidos vegetales permite la obtención de un gran número de plantas en poco tiempo, condiciones controladas y espacios reducidos (Kumar and Loh, 2012). Bajo ciertas modificaciones en el medio de cultivo y factores físicos, las células vegetales pueden proliferar en una forma desordenada, convirtiéndose en una masa de tejido conocida como callo (George *et al.*, 2008). Por otro lado, cuando los callos son sembrados en las condiciones apropiadas, pueden experimentar la diferenciación y convertirse en plantas completas (Gantait *et al.*, 2018). Con base en esto, las investigaciones en el género *Prosopis* se han enfocado en desarrollar metodologías tanto en la organogénesis: como la obtención de cultivos en suspensión de explantes de hipocótilo de *P. laevigata* (Trejo-Espino *et al.*, 2011), así como la inducción de callos como fuente de flavonoides en explantes de *P. farcta* (Zafari *et al.*, 2018); y la embriogénesis somática, donde actualmente solo existen dos reportes para la regeneración de las especies *P. laevigata* (Buendía-González *et al.*, 2012) y *P. alpataco* (Boeri and Sharry, 2018).

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis General

La inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), se puede lograr mediante diferentes tipos de medio de cultivo, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, suplementos y condiciones de incubación.

3.1.2 Hipótesis Específicas

1. El establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *P. glandulosa* se puede lograr mediante el proceso de desinfestación en diferentes medios de cultivo.
2. La inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de *P. glandulosa* se puede lograr mediante diferentes tipos de medio de cultivo, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, suplementos y condiciones de incubación.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Determinar las metodologías que permitan la inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.).

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar diferentes medios de cultivo que permitan el establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *P. glandulosa*.

2. Definir las concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, tipo de medio de cultivo y condiciones de incubación, que permitan la inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de *P. glandulosa*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Clasificación y Descripción Botánica de *Prosopis glandulosa* Torr.

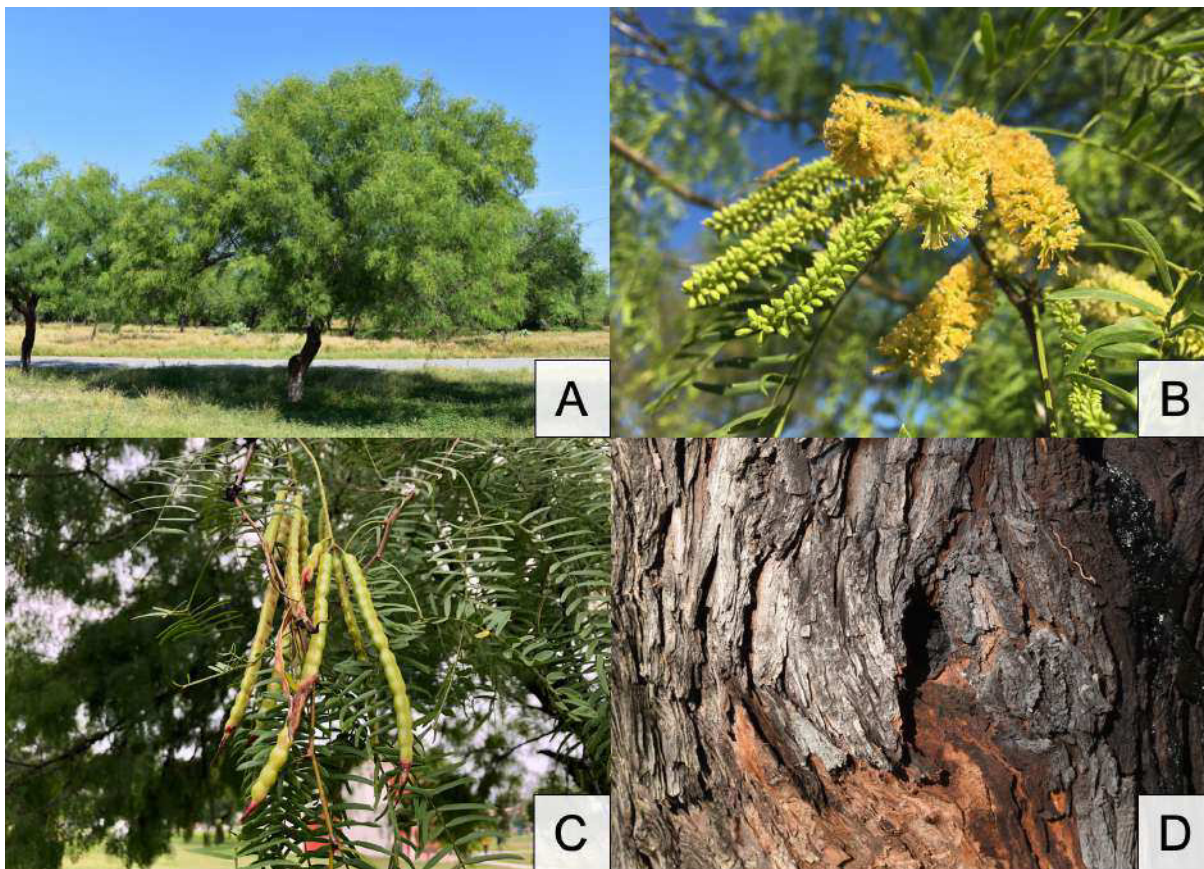


Figura 31. Características taxonómicas de *Prosopis glandulosa*. A) Árbol adulto de mezquite en fructificación; B) Inflorescencias de mezquite; C) Frutos inmaduros y hojas de mezquite; D) Tallo y corteza de mezquite adulto. Fuente: Ibarra-López, (2018).

4.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Eudicotyledoneae
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Mimosoideae
Tribu:	Mimoseae
Género:	<i>Prosopis</i>
Especie:	<i>Prosopis glandulosa</i>

Fuente: Burkart, (1976).

4.1.2 Descripción Botánica

4.1.2.1 Aspecto

Árbol de hasta 10 m de altura, algunas veces en forma arbustiva con varios tallos, con diámetro de hasta 40 cm, espinoso y caducifolio. Bajo condiciones favorables de suelo y humedad, tienen habito arbóreo y en condiciones de aridez extrema habito arbustivo (Palacios, 2006) (Figura 31A).

4.1.2.2 Hojas

Glabras y tienen uno o dos pares de pinnas de 6 a 17 cm de largo que llevan 6 a 17 pares de foliolos cada una. El largo de los foliolos es de 5 a 12 veces su ancho, en la

mayoría de 1 a 4 cm de largo. Están separados a lo largo del raquis a distancias iguales o mayores de su ancho, de forma linear u oblongos, obtusiformes y con una notables nervadura inferior (Correll and Johnston, 1970) (Figura 31C).

4.1.2.3 Flores

Inflorescencias dispuestas en racimos espigados, cilíndricos de 6 a 8 cm de largo, en las axilas de las hojas; cáliz pequeño, ancho campanulado, de 1.3 a 1.5 mm de largo; corola amarillenta de 3 a 4 mm de largo, con 5 pétalos, libres de formar líneas-elípticos (Palacios, 2006) (Figura 31B).

4.1.2.4 Fruto

Vaina fibrosa e indehiscente, recta, lineal de 8 a 20 cm de longitud por 0.7 a 1.3 cm de ancho, glabro, con márgenes ondulados, submoniliformes, no marginados, amarillas con máculas violáceas y estrías rojas longitudinales; articulaciones subcuadradas. Semillas aplanadas rodeadas por una pulpa dulce, cafés sin endospermo. Su tamaño de 6 a 9 mm de largo, 4 a 6 mm de ancho y 2 a 4 mm de grosor. Testa delgada y permeable al agua (Palacios, 2006) (Figura 31C).

4.1.2.5 Tallo

Los individuos de carácter arbustivo pueden mostrar varios tallos dominantes. Los individuos de tipo arbóreo con troncos cortos y torcidos, monopódico o ramificado desde la base. Ramas terminales dispuestas en zigzag, con espinas axilares de 1 a 4.5 cm de largo, a veces en pares, pero por lo común son solitarias. Algunos individuos tienen muy pocas espinas (Correll and Johnston, 1970; Palacios, 2006) (Figura 31D).

4.2 Usos e Importancia de *Prosopis glandulosa*

P. glandulosa Torr., es una fabácea multipropósito y todas las partes del árbol se utilizan. La madera es muy dura con un color deseable y buen acabado, que compara favorablemente con maderas preciosas y generalmente se utiliza en pisos y muebles en México y Estados Unidos. También se utiliza para la fabricación de postes y cercas verdes. La leña es de excelente calidad e imparte un sabor agradable a los alimentos que se cocinan en ella, y el carbón vegetal se comercializa en todo Estados Unidos para la industria alimenticia. Las vainas se utilizan como fuente de forraje para ganado. Las flores son polinizadas por abejas y la miel producida es de alta calidad. Los troncos exudan gomas que es comparable a la de *Acacia senegal*. La corteza es rica en taninos y fibras que se utiliza para el tratamiento de cuero y fabricación de cuerdas, y cada parte del árbol se ha utilizado para medicinas populares (Arce and Medina, 1997; Fredrickson *et al.*, 2006; Bhansali, 2010).

En la actualidad, se ha comprobado su efectividad como tratamiento antidiabético (George *et al.*, 2011); como agente antioxidante y cardioprotector con extractos de hojas (García-Andrade *et al.*, 2013); para la obtención de galactomananos a partir de semillas (Martínez-Ávila *et al.*, 2014); así como para la producción de biocombustibles con el uso de vainas por su alto contenido de azúcares (Park *et al.*, 2012).

4.3 Propagación Tradicional de Mezquites

La mayoría de las especies de mezquite producen abundantes semillas, y este es el método natural de propagación. Siendo especies fabáceas sus semillas poseen una capa dura, por lo que un proceso de escarificación con ácido sulfúrico reduce el tiempo

para su germinación (Arce and Medina, 1997; Rodríguez-Araujo *et al.*, 2017). Sin embargo, desde que la hibridación natural ocurre entre especies, el uso de semillas no es recomendable, generando alta variabilidad genética en la progenie (Bhansali, 2010). La propagación clonal mediante esquejes e injertos es el método más utilizado para la multiplicación de mezquites, no obstante, el número de plántulas obtenidas por estos métodos es altamente dependiente de factores externos y endógenos (Arce and Medina, 1997). Es por lo anterior, que los enfoques para una propagación asexual exitosa en especies del género *Prosopis*, va dirigido en el uso de métodos biotecnológicos, como la micropropagación o la embriogénesis somática (Arce and Medina, 1997; Bhansali, 2010).

4.4 Organogénesis y Embriogénesis Somática en Mezquites

Los estudios de cultivo de tejidos vegetales en especies del género *Prosopis*, abarcan tanto la organogénesis como la embriogénesis somática y a continuación se reportan los más relevantes:

Nandwani and Ramawat (1992), reportaron la regeneración de plántulas de *P. tamarugo* a partir de callos generados de explantes de hipocótilo, cotiledones y hojas, los cuales se obtuvieron con 2.0 mg L⁻¹ de ANA y 0.2 mg L⁻¹ de BAP en medio MS.

Por su parte, Shekhawat *et al.* (1993), estudiaron el efecto del genotipo, edad del árbol, naturaleza del explante y tamaño, temporada de recolecta, posición del explante en el medio, reguladores de crecimiento vegetal, condiciones de incubación y periodo de subcultivo en la propagación clonal de *P. cineraria*, consiguiendo la mayor cantidad de brotes con 0.1 mg L⁻¹ de AIA y 2.5 mg L⁻¹ de BAP en medio MS.

En tanto que, Trejo-Espino *et al.* (2011), establecieron un protocolo para la obtención de cultivos en suspensión de *P. laevigata*, induciendo la formación de callo en explantes de hipocótilo, cotiledonares y foliares utilizando reguladores de crecimiento como kinetina, BAP, 2,4-D, ANA y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T).

En estudios recientes, Buendía-González *et al.* (2012), reportaron la embriogénesis somática de *P. laevigata*, utilizando embriones cigóticos inmaduros. Indujeron la formación de callo embriogénico en medio MS suplementado con diferentes componentes orgánicos, así como BAP, 2,4-D, thidiazuron (TDZ) y AIA. Estas masas embriogénicas se transfirieron a un medio sin RCV, pero suplementado con polietilenglicol (PEG) (3.75 % p/v), obteniendo un 20 % de embriones maduros.

Recientemente, Boeri and Sharry, (2018), reportaron el protocolo de embriogénesis somática en alpataco (*P. alpataco* L.). En este estudio germinaron semillas maduras en medio MS durante dos semanas y posteriormente, utilizaron como explante los ejes embrionarios junto con el nodo cotiledonar y los sembraron en MS más 2,4-D y BAP para generar callo embriogénico. La maduración y germinación la obtuvieron con MS al 50 %.

Asimismo, Zafari *et al.* (2018), indujeron la formación de callo en explantes de hipocótilo, cotiledones y brotes de *P. farcta*, utilizando como reguladores de crecimiento 2,4-D, ANA, BAP y kinetina, con la finalidad de producir flavonoides de alto valor comercial.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del Estudio

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal en la Facultad de Agronomía, Unidad Marín, UANL, ubicado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, Marín, N. L.; y Cultivo de Tejidos Vegetales, en la Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, UANL, localizado en Av. Francisco Villa s/n, Col. Ex Hacienda “El Canadá”, Gral. Escobedo, N. L., durante agosto 2015 hasta abril 2018.

5.2 Material Vegetal

Se utilizaron vainas inmaduras de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), las cuales se recolectaron de árboles en fructificación, ubicados en la Facultad de Agronomía, Unidad Marín, UANL. Los explantes que se utilizaron fueron semillas inmaduras.

5.3 Desinfestación

Las vainas se lavaron superficialmente con detergente líquido (Axion[®]) y se enjuagaron con agua potable (Figura 32A). Posteriormente se retiraron las semillas y se colocaron en 100 mL de agua potable, 5.0 mL de Axion[®] y 3.0 mL de blanqueador comercial (Cloralex[®]) y se mantuvieron en agitación en tres lapsos de 10 min cada uno, finalizando cada uno con enjuagues de agua potable (Figura 32B y C), para después colocarlos en una solución fungicida-bactericida, a base de 2.0 g L⁻¹ de Final Bacter[®]

(sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de oxitetraciclina 6.0 %), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar[®] Gold (azoxistrobina 18 %), 400 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 30 g L⁻¹ de sacarosa, durante 90 min. Concluido el proceso se enjuagaron con agua bidestilada (Figura 32D). Dentro de la campana de flujo laminar, las semillas se sumergieron en etanol 96° por un minuto, continuando con una inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.62 % (30 % v/v Cloralex[®]), más 0.02 % de Tween-20[®] durante 20 min (Figura 32E). Por último, los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada, se retiró la testa y se mantuvieron en una solución de PVP (polivinilpirrolidona) 400 mg L⁻¹, hasta la siembra (Figura 32F, G y H).

5.4 Preparación del Medio de Cultivo

5.4.1 Establecimiento

Las semillas fueron sembradas en las sales básicas de los medios MS (Murashige and Skoog, 1962), DCR (Gupta and Durzan, 1985) y GD (Gresshoff and Doy 1972), los cuales se adicionaron con vitaminas, mioinositol y sacarosa (Apéndice: Cuadros 1A, 2A y 3A) y se suplementaron con 9.06 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel[™]. Después se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL y se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm⁻² de presión por 15 min. Los cultivos fueron incubados en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 24 ± 2 °C, durante ocho semanas.

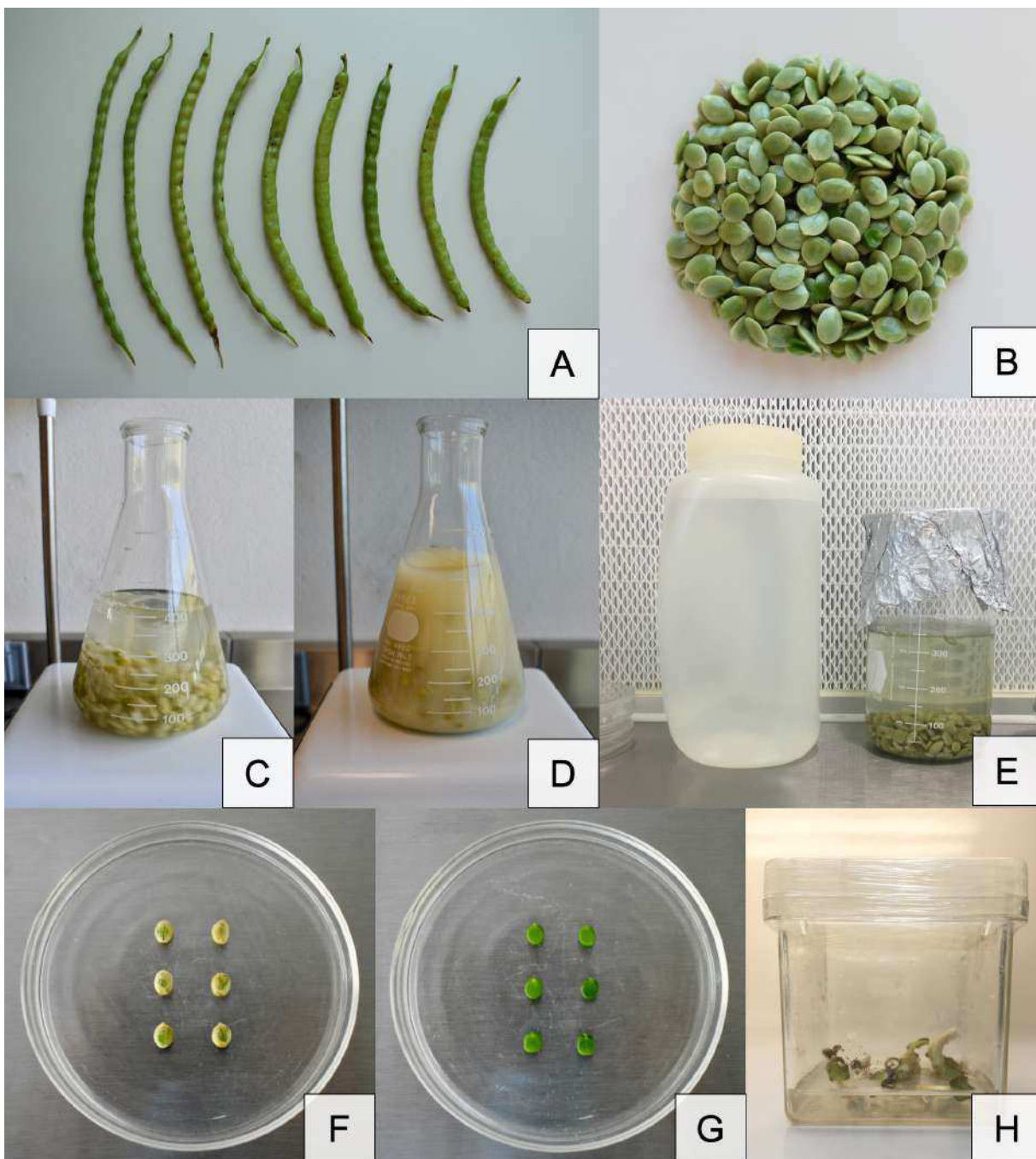


Figura 32. Proceso de desinfección de semillas de *P. glandulosa*. A-B) Vainas y semillas inmaduras de mezquite; C) Lavado en agua potable y jabón líquido; D) Solución bactericida-fungicida; E) Inmersión en 1.62 % de NaClO y agua bidestilada; F-G) Eliminación de la testa de la semilla; H) Siembra *in vitro*.

5.4.2 Inducción de Callo *in vitro*

Se seleccionaron plántulas *in vitro* de mezquite de la etapa de establecimiento, de las cuales se dejó como explante los cotiledones más el eje embrionario. Los explantes fueron transferidos a medio basal MS adicionado con los componentes descritos anteriormente y se suplementaron con lo siguiente:

5.4.2.1 Experimento 1

El medio MS se complementó con las concentraciones de 2.26, 4.53 y 6.79 μM de 2,4-D más 2.32 μM de kinetina. Como tratamiento control, se utilizó el mismo medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5.7. Los medios de cultivo se utilizaron líquidos y semisólidos; agregando 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™ a los semisólidos. Por último, se colocaron en cajas Magenta™ y se esterilizaron bajo las condiciones mencionadas. Los medios semisólidos del experimento se incubaron en total oscuridad o fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C durante ocho semanas; en tanto que los cultivos líquidos se colocaron en un agitador orbital a 80 rpm en total oscuridad o fotoperiodo, bajo la misma temperatura y permanencia descrita anteriormente.

5.4.2.2 Experimento 2

Se utilizó medio basal MS suplementado con 2.26, 4.53, 6.79 y 9.06 μM de 2,4-D más 2.32 μM de kinetina y 10 % de agua de coco (AC); además de un medio sólo con 10 % de AC y un tratamiento control sin reguladores de crecimiento y AC. El pH se ajustó a 5.7. Los medios de cultivo fueron líquidos y semisólidos. En los medios semisólidos se agregó 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™. Los medios se colocaron en cajas Magenta™ y se

esterilizaron bajo las condiciones mencionadas. Los medios semisólidos se incubaron bajo las mismas condiciones de fotoperiodo u oscuridad, temperatura y permanencia que el experimento 1, así como en los medios líquidos probados.

5.4.2.3 Experimento 3

El medio de cultivo anterior se adicionó con 2.26, 4.53 y 6.79 μM de 2,4-D más la combinación de 2.22, 4.44 y 6.66 μM de 6-bencilaminopurina (BAP) y un tratamiento control sin reguladores de crecimiento. El pH fue ajustado como se describe anteriormente. Los medios se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™, se colocaron en cajas Magenta™ y se esterilizaron bajo las condiciones indicadas. Los cultivos se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 24 \pm 2 °C por ocho semanas.

5.4.3 Proliferación de Callo *in vitro*

Los callos *in vitro* generados del experimento 3, fueron transferidos a un medio de proliferación, el cual consistió en las sales básicas de MS más 4.07 μM de 2,4-D y 2.22 μM de BAP, por 12 semanas con intervalos de subcultivo cada dos semanas, incubados bajo los mismos parámetros del experimento 3.

5.5 Diseño Experimental

En la etapa de establecimiento *in vitro* de semillas, se utilizó un diseño completamente al azar con tres medios de cultivo y 10 repeticiones. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de contaminación, oscurecimiento y callogénesis en los explantes a cuatro semanas de la siembra.

En el experimento 1, fue utilizado un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2x2, donde el factor A fueron las concentraciones de reguladores (2,4-D/Kinetina), el factor B el tipo de medio y el factor C las condiciones de incubación; dando un total de 16 tratamientos con seis repeticiones.

El experimento 2 se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 6x2x2, dando un total de 24 tratamientos y seis repeticiones.

El experimento 3 se estableció también en un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y ocho repeticiones.

La variable evaluada para los tres experimentos de inducción realizados fue el porcentaje de callo *in vitro* a cuatro y ocho semanas después del subcultivo.

La unidad experimental para las etapas de establecimiento e inducción fue un recipiente de vidrio o una caja Magenta™ con 2 a 4 semillas o explantes.

Los porcentajes de la etapa de establecimiento e inducción de callo se transformaron mediante la función *Arcoseno*.

Un análisis de varianza se realizó para cada etapa y la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey $p \leq 0.05$. Los resultados se analizaron mediante el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento

El procedimiento de desinfestación utilizado fue efectivo para el establecimiento aséptico de semillas inmaduras de mezquite, donde no se presentó contaminación por bacterias u hongos en los medios de cultivo utilizados; asimismo no se registró oscurecimiento en las mismas, y la viabilidad fue en la totalidad de las semillas sembradas después de su evaluación (Cuadro 15; Figura 33). Las semillas germinaron a partir del cuarto día después de la siembra en el medio MS, de manera uniforme (Figura 33A). La formación de callo fue presente en los tres medios de cultivo evaluados, superando el 40 % en el medio GD (Cuadro 15; Figura 33C). Sin embargo, se continuo la siguiente etapa utilizando el medio MS, debido a que el crecimiento en este medio era mayor en comparación con los demás.

Cuadro 16. Efecto del medio de cultivo en la callogénesis de semillas inmaduras de *P. glandulosa*, en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.

Tratamiento	% Callogénesis
1 MS	19.62 ± 7.4 ab
2 DCR	7.59 ± 4.9 b
3 GD	42.03 ± 10.1 a

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

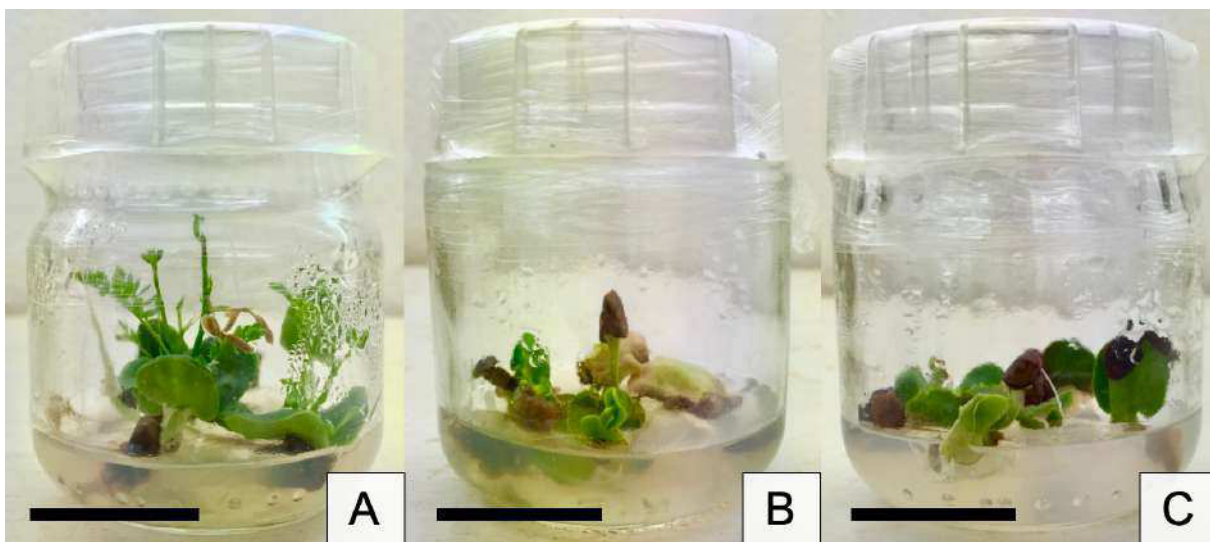


Figura 33. Efecto de los medios de cultivo en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *P. glandulosa*. A) MS; B) DCR; C) GD. Barras: 2.0 cm en A-C.

6.2 Inducción de Callo *in vitro*

En los experimentos 1 y 2, la inducción de callo no sucedió en ningún tratamiento evaluado, por lo que los datos no se muestran, sin embargo, se describen las respuestas en cada uno de los experimentos en el periodo de evaluación.

6.2.1 Experimento 1

Los explantes procedentes de la etapa de establecimiento, se subcultivaron a los tratamientos de inducción del experimento 1. En este estudio, los explantes de mezquite no respondieron positivamente a las concentraciones de 2,4-D y kinetina utilizadas, en el tiempo evaluado. Asimismo, los tipos de medio de cultivo, tanto semisólidos como líquidos y las condiciones de incubación (fotoperiodo y total oscuridad), no permitieron la inducción de callo en los explantes (Figura 34). Además, se observó una tendencia de oxidación de los explantes en los medios de tipo líquido (Figura 34B y C), bajo ambas condiciones de incubación; mientras que, en los medios

semisólidos, se presentaron otras respuestas morfológicas como múltiples brotes adventicios y formación de raíces (Datos no mostrados; Figura 34A).

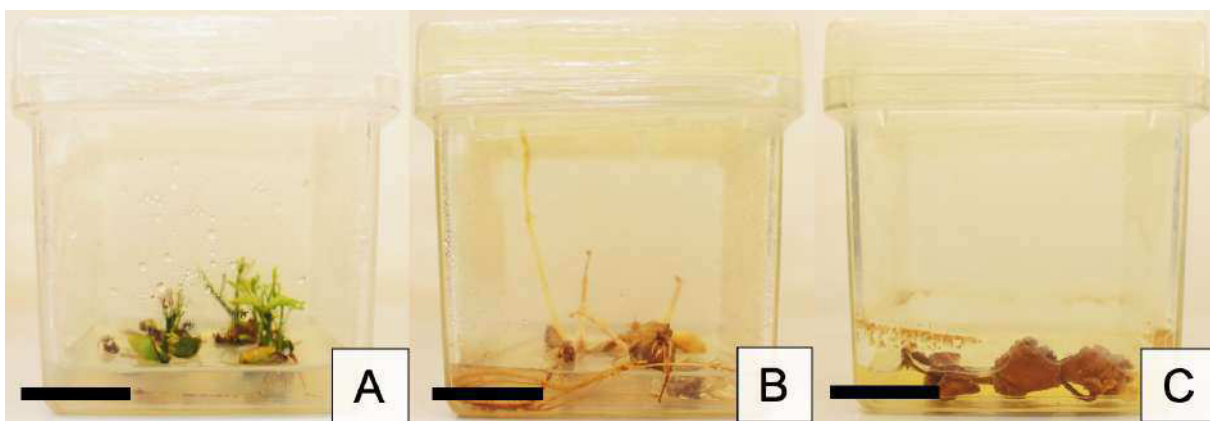


Figura 34. Efecto de los tratamientos de inducción del Experimento 1 en explantes de *P. glandulosa*. A) Formación de brotes adventicios en 2.26 μM 2,4-D en medio semisólido y fotoperiodo; B) Brotes etiolados en 6.79 μM 2,4-D en medio semisólido y oscuridad; C) Oscurecimiento de los explantes en 6.79 μM 2,4-D en medio líquido y fotoperiodo. Barras: 2.0 cm en A-C.

6.2.2 Experimento 2

De la misma forma que el experimento 1, los tratamientos utilizados en este bioensayo no permitieron la inducción de callo en los explantes de mezquite, en el periodo evaluado. La combinación de agua de coco con las concentraciones de 2,4-D/kinetina, el tratamiento con 10% AC y el tratamiento control, en medio semisólido en condiciones de fotoperiodo y oscuridad, permitieron la germinación de las semillas inmaduras; estas plántulas presentaron la formación de brotes adventicios, raíces y tamaño reducido (Datos no mostrados; Figura 35A). Los medios líquidos en ambas condiciones de incubación también presentaron oscurecimiento en los explantes, en el tiempo evaluado (Figura 35B y C).

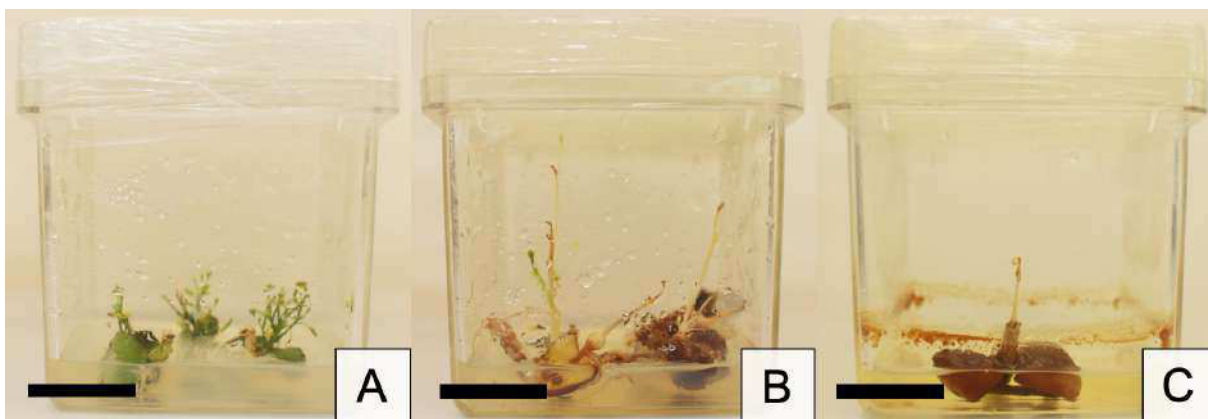


Figura 35. Efecto de los tratamientos de inducción del Experimento 2 en explantes de *P. glandulosa*. A) Formación de brotes adventicios en medio semisólido con 10 % AC, sin reguladores y fotoperiodo; B) Brotes etiolados y oscurecimiento en 2.26 μM 2,4-D más 10 % AC, en medio semisólido y oscuridad; C) Oscurecimiento de los explantes con 9.06 μM 2,4-D más 10 % AC, en medio líquido y fotoperiodo. Barras: 2.0 cm en A-C.

6.2.3 Experimento 3

La inducción de callo *in vitro* en explantes de mezquite, sólo se presentó cuando se utilizaron diferentes concentraciones de 2,4-D combinadas con BAP, en condiciones de fotoperiodo en medio semisólido (Cuadro 16). En relación con los resultados obtenidos del análisis de varianza, se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en las diferentes combinaciones y concentraciones de 2,4-D/BAP, destacando el tratamiento T10 con 6.79/6.66 μM 2,4-D/BAP con la mayor generación de callo en los tiempos evaluados (Cuadro 16; Figura 36J). Valores inferiores se presentaron en los tratamientos T6 (4.53/4.44 μM 2,4-D/BAP), T8 (6.79/2.22 μM 2,4-D/BAP) y T9 (6.79/4.44 μM 2,4-D/BAP), con porcentajes superiores al 50 % a ocho semanas del subcultivo ($p \leq 0.05$; Cuadro 17; Figura 36F, H e I). El tratamiento control y T2 (2.26/2.22 μM 2,4-D/BAP), no presentaron formación de callo durante el primer mes de evaluación (Cuadro 16), inclusive los explantes en el control presentaron la

formación de brotes adventicios (Figura 36A). En este experimento, la coloración de los callos fue variable, de amarillo claro a verde claro y de color crema a café claro. Es importante señalar que, en todos los tratamientos, la presencia de callo inicio en el eje embrionario y se extendió a los cotiledones (Figura 36B-I).

Estos resultados difieren a los reportados por Jordan (1987), donde se obtuvo poca generación de callo en explantes nodales y foliares de *Prosopis tamarugo*, en un medio MS con 5.0 mg L⁻¹ de ANA y 15 mg L⁻¹ de cisteína, no obstante, mencionan que, a partir de los callos la generación de brotes es evidente, como lo que se presentó en el T7 con 4.53/6.66 µM 2,4-D/BAP (Figura 36G). En cambio, en explantes de hipocótilo de *P. laevigata* se reporta inducción de callo similar a los resultados obtenidos en la presente investigación, utilizando 5.0 µM de 2,4-D y BAP en medio MS, sin embargo, se potencia la formación de callo cuando el BAP se combina con 2,4,5-T a 5.0 µM, en explantes de hipocótilo, cotiledonares y foliares (Trejo-Espino *et al.*, 2011). De la misma forma, Zafari *et al.* (2018), reportan alta generación de callo en explantes de hipocótilo de *P. farcta*, cuando se combinan 2.0 mg L⁻¹ de BAP con 3.0 mg L⁻¹ de kinetina en medio MS, sin embargo, la combinación de 2,4-D a 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ con 1.0 mg L⁻¹ de kinetina presentó resultados satisfactorios.

Cuadro 17. Efecto de 2,4-D/BAP en la formación de callo *in vitro* en explantes de *P. glandulosa*, a cuatro y ocho semanas del subcultivo.

Tratamiento	% Callogénesis			
	Primer mes		Segundo mes	
T1 Control	0.0 ± 0.0	c	0.0 ± 0.0	d
T2 2.26 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	0.0 ± 0.0	c	4.4 ± 2.1	cd
T3 2.26 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	50.61 ± 10.5	ab	50.61 ± 10.5	ab
T4 2.26 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	29.33 ± 14.8	bc	40.59 ± 15.9	abcd
T5 4.53 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	36.17 ± 11.7	abc	36.17 ± 11.7	bcd
T6 4.53 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	49.4 ± 13.4	ab	56.24 ± 11.4	ab
T7 4.53 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	31.87 ± 14.0	bc	46.87 ± 13.7	abc
T8 6.79 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	43.76 ± 8.9	abc	55.01 ± 8.1	ab
T9 6.79 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	68.71 ± 11.7	ab	79.96 ± 6.6	ab
T10 6.79 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	83.15 ± 6.8	a	83.15 ± 6.8	a

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

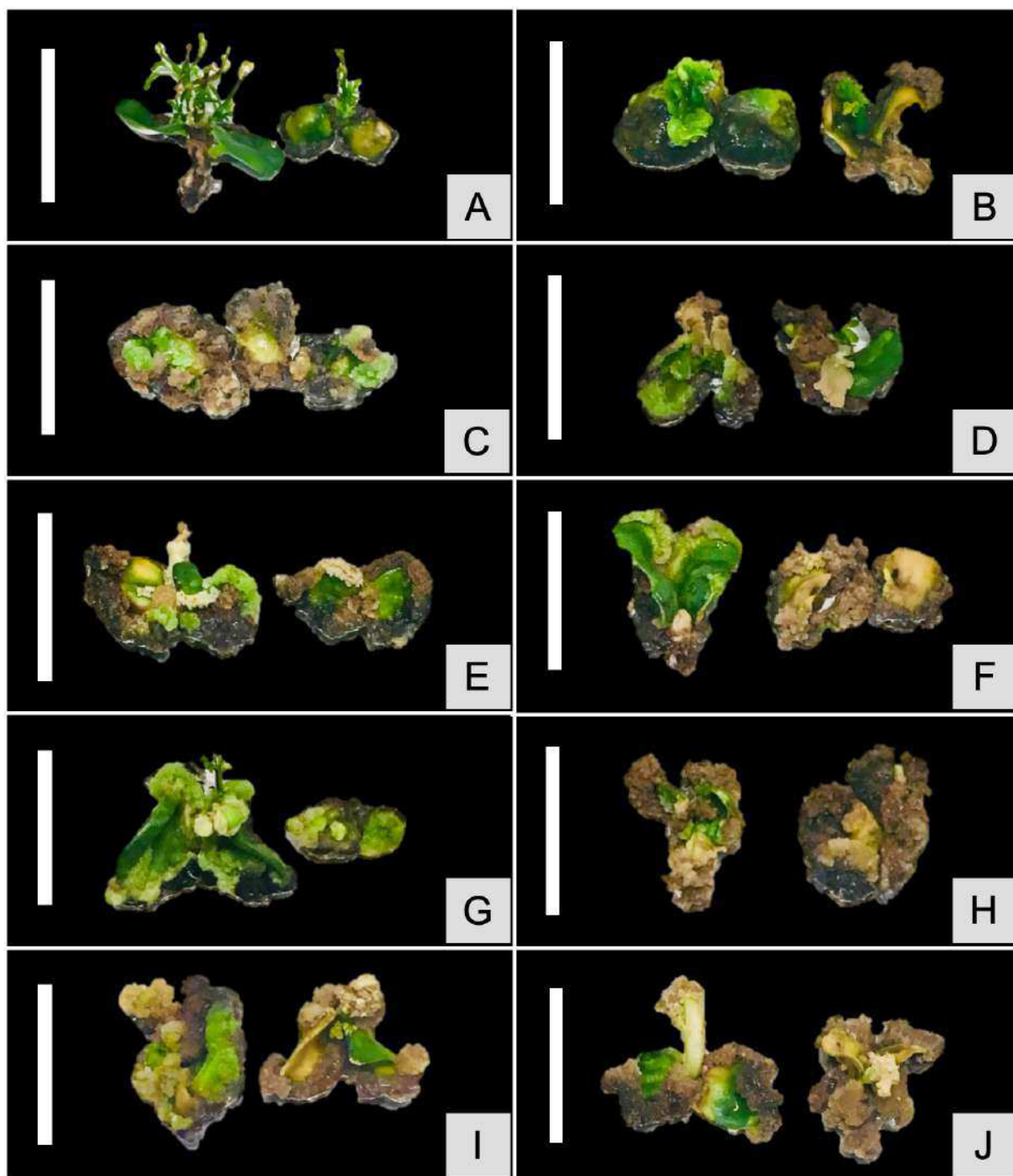


Figura 36. Efecto de los tratamientos de inducción del Experimento 3 en explantes de *P. glandulosa* a ocho semanas del subcultivo. A) Brotes adventicios en medio sin reguladores; Formación de callo en hipocótilo y cotiledones y oscurecimiento en; B) 2.26/2.22 μM 2,4-D/BAP; C) 2.26/4.44 μM 2,4-D/BAP; D) 2.26/6.66 μM 2,4-D/BAP; E) 4.53/2.22 μM 2,4-D/BAP; F) 4.53/4.44 μM 2,4-D/BAP; G) 4.53/6.66 μM 2,4-D/BAP; H) 6.79/2.22 μM 2,4-D/BAP; I) 6.79/4.44 μM 2,4-D/BAP; J) 6.79/6.66 μM 2,4-D/BAP. Barras: 1.0 cm en A-J.

6.3 Proliferación de Callo *in vitro*

Concluida la etapa de inducción, los callos obtenidos en los tratamientos fueron subcultivados por 12 semanas a medio de proliferación, en lapsos de dos semanas. Durante este tiempo, la mayoría de los callos comenzaron a presentar oscurecimiento (Figura 37), lo cual es un efecto de los subcultivos continuos, que ha sido reportado en callos de *P. tamarugo* (Jordan, 1987); así como callos de *P. farcta* (Zafari *et al.*, 2018), quienes recomiendan el uso de asparagina en el medio de cultivo para disminuir el oscurecimiento de los callos. También se presentó la formación de brotes a partir de los callos, aunque el oscurecimiento también se presentó (Figura 37B). Coincidiendo con nuestros resultados, Nandwani and Ramawat (1992), reportan la generación de brotes a partir de callos de *P. tamarugo* incorporando BAP a medio de cultivo MS; mientras que Shekhawat *et al.* (1993), mencionan que, agregando ácido ascórbico, ácido cítrico y PVP, se puede disminuir el oscurecimiento en los explantes. Otro efecto generado durante la proliferación fue la inducción de callo embriogénico (Figura 37A). En los últimos años se han realizado diversos estudios para mejorar la formación de callos embriogénicos, mediante la optimización de factores relacionados con el medio de inducción, particularmente, reguladores de crecimiento (Buendia-González *et al.*, 2012). Rai *et al.* (2007), mencionan que las auxinas, generalmente 2,4-D, se requieren en bajas concentraciones para la inducción de callo embriogénico, combinadas con alguna citocinina. Los resultados del presente estudio solo fueron positivos cuando se combinó el 2,4-D con BAP y no con kinetina; aunque cabe mencionar que la inducción de callo está restringida a ciertas células de los explantes y es determinada por el grado de desarrollo del tejido (Rai *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008).

El efecto obtenido en esta etapa es afín con Buendía-González *et al.* (2012), donde se presentó la formación de callo embriogénico en ejes embrionarios, a partir de explantes maduros e inmaduros de *P. laevigata*, con 2.26/6.66 μM 2,4-D/BAP. Asimismo, es similar con la etapa de inducción de callo embriogénico en nodos cotiledonares de *P. alpataco* (Boeri and Sharry, 2018). Igualmente, con combinaciones afines de 2,4-D/BAP, se permitió la inducción de callo embriogénico en explantes de *Leucaena leucocephala* (Rastogi *et al.*, 2008); *Acacia catechu* (Rout *et al.*, 1995); *A. nilotica* (Garg *et al.*, 1996); *A. sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002) y *A. arabica* (Nanda and Rout, 2003).

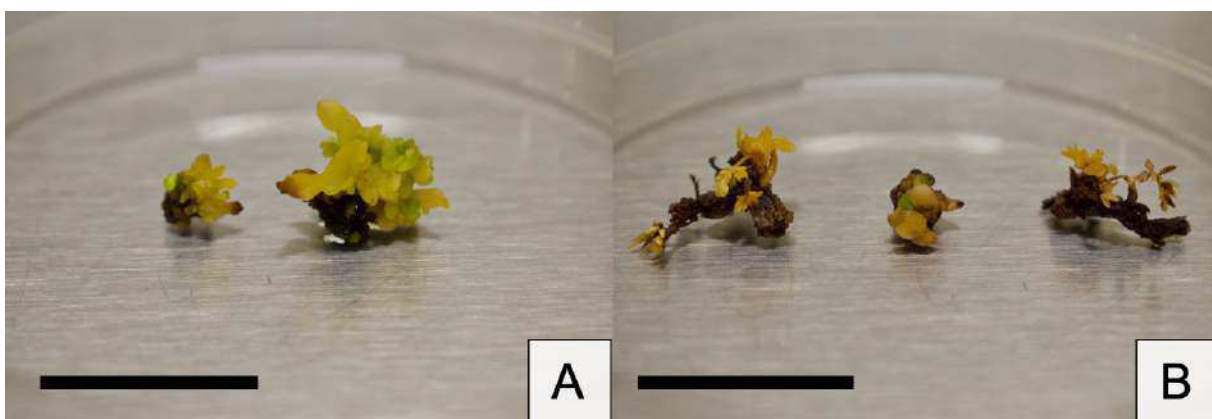


Figura 37. Efecto del medio de proliferación en explantes de *P. glandulosa* a 12 semanas del subcultivo. A) Formación de callo embriogénico y oscurecimiento; B) Formación de brotes y oscurecimiento. Barras: 2.0 cm en A y B.

7. CONCLUSIONES

1. En la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *P. glandulosa*, el proceso de desinfestación permitió la viabilidad en los medios de cultivo utilizados.
2. En la etapa de inducción, los experimentos con las combinaciones de 2,4-D/kinetina y suplementos, en medios semisólido y líquido, y en condiciones de fotoperiodo y oscuridad, no fueron parámetros adecuados para la generación y proliferación de callo en explantes de *P. glandulosa*.
3. Las mayores concentraciones de 2,4-D/BAP utilizadas en el experimento 3, en medio MS semisólido y fotoperiodo, permitieron la mayor generación de callo en explantes de *P. glandulosa*, en los tiempos evaluados.
4. La etapa de proliferación permitió la morfogénesis indirecta, así como la inducción de callo embriogénico.

8. RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se formalizan las siguientes sugerencias:

1. Es primordial utilizar semillas inmaduras que no hayan iniciado la formación de tegumentos, ya que su eliminación demora el proceso de establecimiento, así como generar oscurecimiento en los explantes.
2. Es recomendable reducir la etapa de inducción a por lo menos cinco semanas, puesto que los callos comienzan a sufrir oscurecimiento alrededor de la sexta semana.
3. En la etapa de proliferación se sugiere que los subcultivos se efectúen cada tres semanas, para reducir el oscurecimiento, así como probar el efecto de total oscuridad para potenciar la proliferación de estos.
4. Se aconseja que durante las etapas de inducción y proliferación se incorpore algún antioxidante como PVP o ácido ascórbico, para reducir el oscurecimiento de los callos entre subcultivos.
5. Es conveniente plantear las metodologías que permitan mayor proliferación de callo embriogénico, ya que actualmente esta área no está cubierta en la especie *P. glandulosa*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade-Montemayor, H. M., A. V. Cordova-Torres, T. García-Gasca and J. R. Kawas. 2011. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research* 98:83-92.
- Arce, J. P. and M. C. Medina. 1997. Micropropagation of *Prosopis* species (mesquites). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture Forestry* 39. High-Tech and Micropropagation V. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 367-380.
- Bhansali, R. R. 2010. Biology and multiplication of *Prosopis* species grown in the Thar Desert. In: Ramawat, K. G. (ed.). *Desert Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 371-406.
- Bhojwani, S. S. and P. K. Dantu. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer India. 309 p.
- Boeri, P. and S. Sharry. 2018. Somatic Embryogenesis of Alpataco (*Prosopis alpataco* L.). In: Jain, S. M. and P. Gupta. (eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*, *Forestry Sciences* 85, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018. pp. 189-198.
- Buendía-González, L., M. E. Estrada-Zúñiga, J. Orozco-Villafuerte, F. Cruz-Sosa and E. J. Vernon-Carter. 2012. Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:287-296.

- Burkart, A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). (Part 1 and 2). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. Journal of the Arnold Arboretum 57:219-249; 450-525.
- Céspedes-Flores, S. E. y E. Moreno-Sánchez. 2010. Estimación del valor de la pérdida de recurso forestal y su relación con la reforestación en las entidades federativas de México. Investigación Ambiental 2(2):5-13.
- Chaires-Martínez, L., J. A. Salazar-Montoya and E. G. Ramos-Ramírez. 2008. Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). European Food Research and Technology 227:1669-1676.
- Correll, D. S. and M. C. Johnston. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Volume 6. Texas Research Foundation. Renner. Texas, USA. pp. 761-794.
- Estrada, C. A. y J. Marroquín de la Fuente. 1992. Leguminosas del Centro-Sur de Nuevo León. Reporte Científico 10. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México. 258 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Informe principal. Roma, Italia. 339 p.
- FAO y CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2011. Situación de los Recursos Genéticos Forestales en México. Informe Final del proyecto TCP/MEX/3301/MEX (4). 75 p.
- Foroughbakhch, R., M. A. Alvarado-Vázquez, J. L. Hernández-Piñero, A. Rocha-Estrada, M. A. Guzmán-Lucio and E. J. Treviño-Garza. 2006. Establishment, growth and biomass production of 10 tree Woody species introduced for

- reforestation and ecological restoration in northeastern Mexico. *Forest Ecology and Management* 235:194-201.
- Foroughbakhch, R., J. L. Hernández-Piñero, M. A. Alvarado-Vázquez, E. Céspedes-Cabriales, A. Rocha-Estrada and M. L. Cárdenas-Avila. 2009. Leaf biomass determination on woody shrub species in semiarid zones. *Agroforest Syst* 77:181-192.
- Fredrickson E. L., R. E. Estell, A. Laliberte and D. M. Anderson. 2006. Mesquite recruitment in the Chihuahuan Desert: historic and prehistoric patterns with long-term impacts. *Journal of Arid Environments* 65(2):285-295.
- García-Andrade, M., R. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, M. Rosales-Castro and L. Medina-Torres. 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products* 44:336-342.
- Garg, L., N. N. Bhandari, V. Rani and S. S. Bhojwani. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Reports* 15:855-858.
- George, E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. *Plant propagation by Tissue Culture*, 3rd ed. Volume 1. The Background. Springer, Netherlands. 501 p.
- George, C., A. Lochner and B. Huisamen. 2011. The efficacy of *Prosopis glandulosa* as antidiabetic treatment in rat models of diabetes and insulin resistance. *Journal of Ethnopharmacology* 137:298-304.
- Golubov, J., M. Mandujano and L. E. Eguiarte. 2001. The paradox of mesquites (*Prosopis* spp): invading species of biodiversity enhancers. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 69: 21-28.

- Gresshoff P. M. and C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107:161-170.
- Gupta, P. K. and D. J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* 4:177-179.
- Henciya, S., P. Seturaman, A. R. James, Y. H. Tsai, R. Nikam, Y. C. Wu, H. U. Dahms and F. R. Chang. 2017. Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *Journal of Food and Drug Analysis* 25:187-196.
- Jordan, M. 1987. In vitro culture of *Prosopis* species. In: Bonga, J. M., *et al.* (eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Springer Science+Business Media Dordrecht. pp. 370-384.
- Kumar, P. P. and C. S. Loh. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. In: Altman, A. and P. M. Hasegawa (eds.). *Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century*. Elsevier. pp. 131-138.
- Martin, S. C. and R. R. Alexander. 1974. *Prosopis juliflora* (Swartz) D. C. Seeds of woody plants in the United States. *Agric. Hand Book* 450:656-657.
- Martínez-Ávila, G. C. G., A. Y. Hernández-Almanza, F. D. Sousa, R. Moreira, G. Gutiérrez-Sánchez and C. N. Aguilar. 2014. Macromolecular and functional properties of galactomannan from mesquite seeds (*Prosopis glandulosa*). *Carbohydrate Polymers* 102:928-931.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.

- Nanda, R. M. and G. R. Rout. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73:131-135.
- Nandwani, D. and K. G. Ramawat. 1992. High frequency plantlets regeneration from seedling explants of *Prosopis tamarugo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:173-178.
- Ngangyo Heya, M., R. Maiti, R. Foroughbakhch, and A. Carrillo-Parra. 2017. Biology, Productivity and Bioenergy of Timber-Yielding Plants. An Experimental Technology. Springer International Publishing. 141 p.
- Palacios, R. A. 2006. Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y Distribución Geográfica. Bol. Soc. Argent. Bot. 41(1-2):99-121.
- Park, S. C., R. J. Ansley, M. Mirik and M. A. Maindrault. 2012. Delivered biomass costs of honey mesquite (*Prosopis glandulosa*) for bioenergy uses in the South-Central USA. Bioenerg. Res. 5:989-1001.
- Quiroz-Figueroa, F., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos and V. M. Vargas. 2006. Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue Organ Cult 86:285-301.
- Rai, M. K., N. Akhtar and V. S. Jaiswal. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Sci. Hort. 113:129-133.
- Rastogi, S., S. M. H. Rizvi, R. P. Singh and U. N. Dwivedi. 2008. *In vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis. Biologia Plantarum 53(4):743-748.
- Rodríguez-Araujo, M. E., D. R. Pérez and G. L. Bonvissuto. 2017. Seed germination of five *Prosopis* shrub species (Fabaceae-Mimosoideae) from the Monte and

- Patagonia phytogeographic provinces of Argentina. *Journal of Arid Environments*. pp. 1-4.
- Rout, G. R., S. Samantaray and P. Das. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* – a multipurpose leguminous tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42:283-285.
- Shekhawat, N. S., T. S. Rathore, R. P. Singh, N. S. Deora and S. R. Rao. 1993. Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation* 12:273-280.
- Trejo-Espino, J. L., M. Rodríguez-Monroy, E. J. Vernon-Carter and F. Cruz-Sosa. 2011. Establishment and characterization of *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnst. Cell suspension culture: a biotechnology approach for mesquite gum production. *Acta Physiol Plant* 33:1687-1695.
- Vengadesan, C., A. Ganapathi, V. Ramesh Anbazhagan and R. Prem Anand. 2002. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 38:52-57.
- Zafari, S., M. Sharifi and N. A. Chashmi. 2018. A comparative study of biotechnological approaches for producing valuable flavonoids in *Prosopis farcta*. *Cytotechnology* 70:603.

CAPÍTULO 5. INDUCCIÓN DE CALLO *in vitro* RETAMA (*Parkinsonia aculeata* L.)

1. RESUMEN

La retama (*Parkinsonia aculeata* L.) es una fabácea multipropósito originaria de las regiones tropicales de América. Sus hojas se han utilizada en la medicina tradicional para tratar la fiebre, la malaria, diabetes y con fines abortivos. Además, se utiliza como fuente forestal para la obtención de madera y leña, y como fuente alimento para ganado. Esta especie se propaga generalmente por semilla, sin embargo, posee tegumentos impermeables y testa endurecida, por lo que se utilizan métodos de escarificación. Asimismo, se genera alta variabilidad genética en la descendencia. Por tanto, es indispensable la implementación de métodos alternos para su regeneración asexual. El cultivo de tejidos vegetales es una rama de la biotecnología vegetal, que permite el desarrollo acelerado de diferentes órganos y tejidos vegetales en un medio de cultivo y bajo condiciones controladas. Entre sus técnicas se encuentra el cultivo de callo, el cual es una masa desorganizada de células que se generan a partir de explantes vegetales. En esta investigación se desarrollo un protocolo para la inducción de callo a partir de semillas inmaduras de *P. aculeata*. Estas semillas fueron desinfestadas y sembradas en tres medios de establecimiento. La formación de callo y viabilidad fue mayor en el medio de cultivo MS, por lo que se continúo utilizado este medio en la siguiente etapa. En la inducción, el medio MS se suplementó con ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP), en diferentes

concentraciones y combinaciones. Una vez finalizado el tiempo de evaluación, la generación de callo fue consistente en todos los tratamientos a excepción del tratamiento control, que no genero callo. Posteriormente, los callos se colocaron en un medio de proliferación utilizando medio MS adicionado con dosis bajas de 2,4-D y BAP. En esta etapa los callos se subcultivaron a medio nuevo cada dos semanas, completando un total de 10 semanas. Al final del periodo, se observó que los callos continuaban proliferando y en algunas unidades experimentales se originaron brotes a partir de morfogénesis indirecta.

2. ABSTRACT

Jerusalem thorn (*Parkinsonia aculeata* L.) is a multipurpose fabaceous native to the tropical regions of America. Its leaves have been used in traditional medicine to treat fever, malaria, diabetes and for abortive purposes. In addition, it is used as a forest source for obtaining wood and firewood, and as a source of livestock feed. This species propagates generally by seed, nevertheless, it possesses impermeable teguments and seed coat hardened, reason why methods of scarification are used. Likewise, high genetic variability in offspring is generated. Therefore, the implementation of alternative methods for their asexual regeneration is indispensable. Plant tissue culture is a branch of plant biotechnology, which allows the accelerated development of different plant organs and tissues in a culture medium and under controlled conditions. Among its techniques is callus culture, which is a disorganized mass of cells that are generated from plant explants. In this research, a protocol was developed for the induction of callus from immature seeds of *P. aculeata*. These seeds were disinfested and planted in three establishment media. Callus formation and viability was higher in the MS culture medium, so this medium was continued in the next stage. In induction, the MS medium was supplemented with 2,4-diclofenoxiacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP), in different concentrations and combinations. Once the evaluation time was over, the callus generation was consistent in all the treatments except for the control treatment, which did not generate callus. Subsequently, the calluses were placed in a proliferation medium using MS medium added with low doses

of 2,4-D and BAP. In this stage the calluses were subcultured to new medium every two weeks, completing a total of 10 weeks. At the end of the period, it was observed that the calluses continued to proliferate and in some experimental units' outbreaks originated from indirect morphogenesis.

3. INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, la riqueza de recursos naturales y la diversidad biológica en México han disminuido considerablemente, debido principalmente a problemas ambientales, como la sobreexplotación y contaminación de acuíferos, extinción de especies, contaminación, degradación de suelos y, de mayor importancia, la deforestación (Céspedes-Flores y Moreno-Sánchez, 2010), provocando la mayor pérdida en superficie de la vegetación de tipo matorral xerófilo (FAO y CONAFOR, 2011), ocasionando que actualmente menos del 2 % del matorral original sobreviva (Alexander *et al.*, 2016). Este tipo de vegetación se compone de cerca de 60 especies leñosas y se extiende en el sureste de Texas y noreste de México, proporcionando el hábitat de una gran diversidad de fauna, así como para su uso en la producción forestal y silvopastoril (Foroughbakhch *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2016; Ngangyo Heya *et al.*, 2017).

Recientemente, la necesidad de reforestar áreas perturbadas con especies nativas ha ido en crecimiento (Hall *et al.*, 2011), por lo que se han implementado esfuerzos en la conservación de estas especies (FAO y CONAFOR, 2011), como la protección y restauración de hábitats *in situ* y como métodos *ex situ*, los bancos de germoplasma, cultivo de tejidos vegetales y los bancos de criopreservación (Li and Pritchard, 2009). La retama (*Parkinsonia aculeata* L.), es una fabácea espinosa nativa de las regiones tropicales y semiáridas del continente americano (Weber, 2003). Es utilizada tradicionalmente para tratar la fiebre, malaria y reumatismos (Divya *et al.*, 2011), como

agente antidiabético (Almeida *et al.*, 2005) y para tratar la hiperglicemia (Leite *et al.*, 2011).

La propagación tradicional de retama se lleva a cabo por semilla, sin embargo, estas son caracterizadas por tener una testa dura y tegumentos impermeables (Barroso *et al.*, 1999), por lo que requieren procesos de escarificación (Mohnot and Chatterji, 1965). Por tanto, es necesario que se desarrollen métodos alternos para su propagación clonal. El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que permite el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales aislados de una planta madre, en un medio artificial (George *et al.*, 2008). Dentro de sus técnicas, se encuentra el cultivo de callo, el cual es una masa irregular de tejido parenquimatoso con loci meristemático, que se puede diferenciar en estructuras organizadas como raíces, brotes o embriones (Bhojwani and Dantu, 2013). Hasta la fecha sólo existen dos reportes del uso de *P. aculeata* en cultivo de tejidos vegetales, la micropropagación (Mathur and Mukunthakumar, 1992) y la germinación de semillas maduras (Gomes, 2007), sin embargo, no se cuenta con referencia del empleo de la especie en la inducción de callo *in vitro*.

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis General

La inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de retama (*Parkinsonia aculeata* L.), se puede lograr mediante diferentes tipos de medio de cultivo, así como diferentes concentraciones y combinaciones de 2,4-D/BAP.

3.1.2 Hipótesis Específicas

1. El establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *P. aculeata*, se puede lograr mediante el proceso de desinfestación en diferentes medios de cultivo.
2. La inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de *P. aculeata*, se puede lograr mediante diferentes combinaciones y concentraciones de 2,4-D/BAP en el medio de cultivo.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Establecer las metodologías que permitan la inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de retama (*Parkinsonia aculeata* L.).

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar diferentes medios de cultivo que permitan el establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *P. aculeata*.
2. Determinar las concentraciones y combinaciones de 2,4-D/BAP, que permitan la inducción de callo *in vitro* en semillas inmaduras de *P. aculeata*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Clasificación y Descripción Botánica de *Parkinsonia aculeata* L.

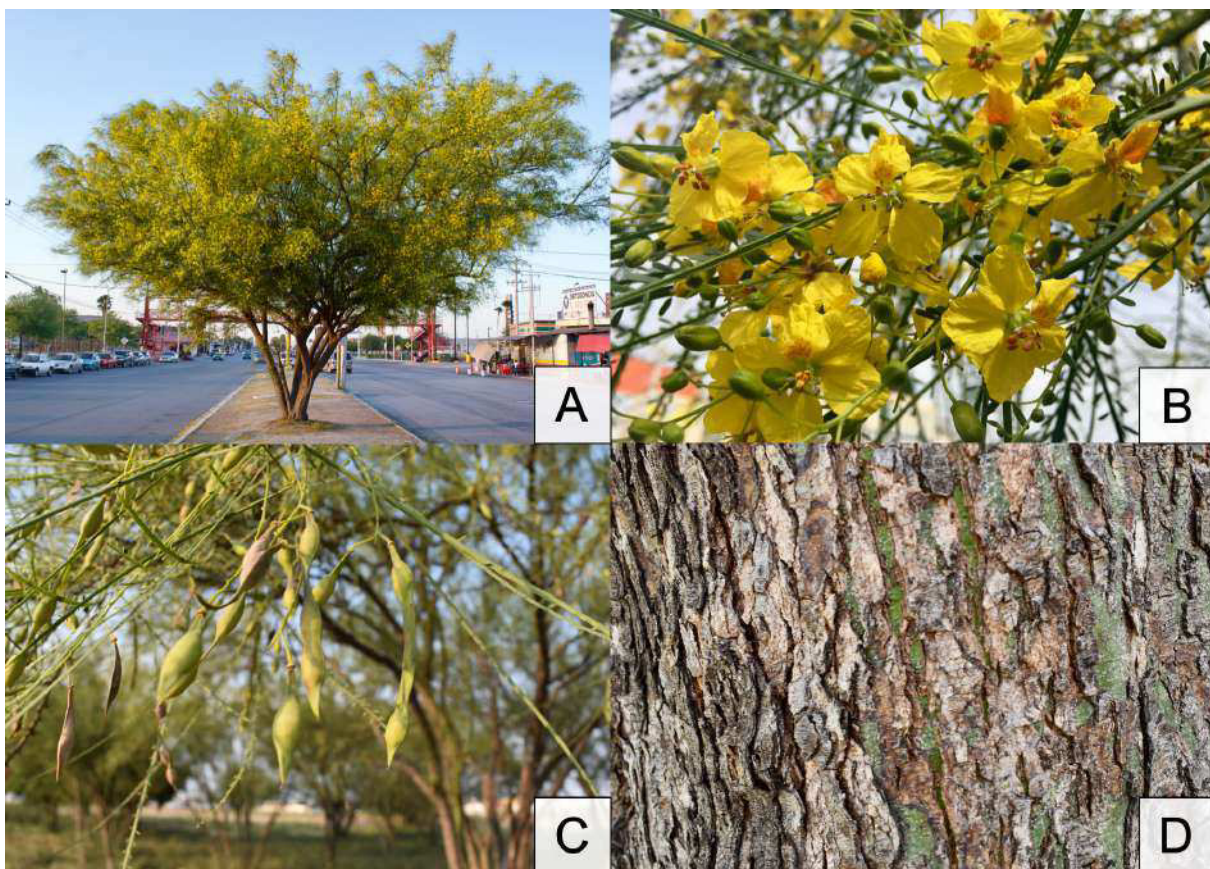


Figura 38. Características taxonómicas de *Parkinsonia aculeata*. A) Árbol adulto de retama en floración; B) Flores y tipo de hojas de retama; C) Frutos inmaduros de retama; D) Tallo y corteza de retama adulto. Fuente: Ibarra-López, (2018).

4.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Eudicotyledoneae
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Caesalpinioideae
Tribu:	Caesalpinieae
Género:	<i>Parkinsonia</i>
Especie:	<i>Parkinsonia aculeata</i>

Fuente: USDA, (2006).

4.1.2 Descripción Botánica

4.1.2.1 Aspecto

Arbustos o árboles pequeños de hasta 8 m de altura y hasta 14 cm de diámetro en el tronco, a menudo ramificado desde abajo, con una copa muy abierta de ramas extendidas y follaje colgante y muy ralo, verde durante todo el año (Little *et al.*, 2001) (Figura 38A).

4.1.2.2 Hojas

Follaje plumoso, hojas alternas, bipinnadas, casi sésiles, consistiendo en un eje principal muy corto que termina en una espina y 1 o 2 pares de ejes laterales colgantes

de 20 a 30 cm de largo y de 2 cm de ancho, planos y ligeramente gruesos. Cada tira colgante con 20 a 30 pares de folíolos finos de 2.4 mm de largo, oblongos, caedizas, color verde y con función de una hoja después de la caída de los folíolos (Correll and Johnston, 1970; Little *et al.*, 2001) (Figura 38B).

4.1.2.3 Flores

En racimos cortos, algunas veces solitarias en el eje, de aproximadamente 1 cm, ligeramente simétricas bilateralmente; el tubo del cáliz corto con 5 sépalos separados y angostos, color castaño amarillento de 0.45 cm de largo, virado hacia abajo; 5 pétalos subiguales y anchos de 0.5 a 1.2 cm, de color amarillo brillantes teñidos de color anaranjado y vellosos en la base, los superiores encerrados por los otros entre capullos con manchas rojas tornándose rojo al marchitarse; 10 estambres de 0.6 cm de largo con filamentos verdes y anteras color castaño; y pistilo teñido de rojo de 0.6 cm de largo con ovario unicelular, veloso y estilo delgado (Correll and Johnston, 1970; Little *et al.*, 2001) (Figura 38B).

4.1.2.4 Fruto

Vainas torulosas de 5 a 10 cm de largo, ligeramente aplanadas, marrones, deciduas, de válvula delgada; semillas de 2 a 5, oblongas, color castaño oscuro, orientadas longitudinalmente en la vaina, casi tan gruesas como anchas (Correll and Johnston, 1970; Little *et al.*, 2001) (Figura 38C).

4.1.2.5 Tallo

La corteza es lisa y muy fina, color verde amarillento o verde azulado, pero tornándose color castaño con grietas o escamas en los troncos grandes. La corteza interior es color verde y de sabor ligeramente amargo. Ramas delgadas ligeramente en zigzag, color verde, con pelos diminutos cuando nuevas y estípulas cortas, pareadas en los nudos contiguas a la espina más grande de 1 a 2 cm, que termina el eje de la hoja. Estas estípulas pueden permanecer en las ramas y en el tronco en grupos de 3 o solitarias (Little *et al.*, 2001) (Figura 38D).

4.2 Usos e Importancia de *Parkinsonia aculeata*

La retama (*P. aculeata*) es una fabácea de usos múltiples, valorada como árbol de sombra y ornamental (Marzouk *et al.*, 2013) y con fines melíferos (Novara, 1984). Asimismo, durante décadas, la especie se ha utilizado en la medicina popular debido al alto contenido de compuestos fenólicos (Leite *et al.*, 2007), además de presentar alcaloides y esteroides principalmente en hojas, tallos y flores (Tewari *et al.*, 2005). En su totalidad, la especie se utiliza como antipirético (Hussain and Prasad, 1966; Hassan *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2016). Mientras que los extractos de hojas tienen funciones diaforéticas y abortivas (Hussain and Prasad, 1966; Sharma *et al.*, 2016), hepatoprotectoras (Hassan *et al.*, 2008; Hundekari *et al.*, 2012), para tratar la malaria (Sharma *et al.*, 2016), enfermedades bacterianas (Ali *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 2008), tripanosomiasis e ictericia (Hassan *et al.*, 2008), diabetes (Leite *et al.*, 2007), hiperglucemia (Almeida *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2016b) y más recientemente como antimutagénico (Sharma *et al.*, 2016) y para el control de la obesidad (Araújo *et al.*, 2016a).

También destaca su uso como especie forestal para la producción de leña, carbón y madera (Foroughbakhch *et al.*, 2009), para la fabricación de mangos de herramientas, envases, tornería, paneles de aglomerado, pasta de papel y como fibra textil (Tinto, 1977); mientras que las vainas pueden utilizarse como alimento para ganado bovino y caprino (Gomes, 2007).

4.3 Propagación Tradicional del Género *Parkinsonia*

El género *Parkinsonia* se propaga por lo general mediante semillas, las cuales son caracterizadas por presentar una testa muy endurecida cuando son maduras (Barroso *et al.*, 1999) y tegumentos impermeables (Bewley and Black, 1994), que es una característica común en las especies de la familia Fabaceae (Biancheti and Ramos, 1982); por lo cual los métodos de escarificación químicos han sido implementados (Mohnot and Chatterji, 1965). Además, el uso de semillas provoca que la población resultante sea heterogénea y el genotipo parental quede alterado en la descendencia (Abedini, 2005). Por tanto, se han desarrollado métodos alternos de propagación asexual utilizando estacas que se trataron con ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido 1-naftalenacético (ANA), para la producción de brotes y raíces (Abedini, 2005).

4.4 Cultivo *in vitro* en Tribu Caesalpinieae

Hasta la fecha, la especie *P. aculeata* se ha trabajado solamente dos veces en condiciones *in vitro*. El primer reporte fue de Mathur and Mukunthakumar, (1992), quienes realizaron la micropropagación de la especie a partir de explantes nodales de árboles adultos. Posteriormente, Gomes, (2007), realizó la germinación *in vitro* de semillas maduras en medio MS.

Dentro de las especies de la Tribu Caesalpinieae se han desarrollado protocolos para su regeneración mediante cultivo de tejidos vegetales. Se realizó la organogénesis indirecta de *Caesalpinia bonduc* utilizando epicótilos (Cheruvathur *et al.*, 2010), pulvinos (Cheruvathur *et al.*, 2012) y raíces (Santosh Kumar *et al.*, 2012) como explantes. Mientras que solo existe un reporte de la micropropagación de *Caesalpinia pulcherrima* empleando brotes nodales (Rahman, *et al.*, 1993).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del Estudio

La presente investigación se llevo a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, UANL, el cual se localiza en Av. Francisco Villa s/n, Col. Ex. Hacienda “El Canadá”, Gral. Escobedo, N. L., durante el periodo abril 2017 a mayo 2018.

5.2 Material Vegetal

Fueron utilizadas vainas inmaduras de retama (*Parkinsonia aculeata* L.), las cuales se recolectaron de árboles adultos en fructificación, localizados en la Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, UANL, en Gral. Escobedo, N. L. Como explante inicial se utilizaron semillas inmaduras (Figura 39A y B).

5.3 Desinfestación

Las vainas se lavaron superficialmente con detergente liquido (Axion[®]), y se enjuagaron con agua potable (Figura 39A) Después se retiraron las semillas y se colocaron en una solución jabonosa de 100 mL de agua potable, 5.0 mL de Axion[®] y 3.0 mL de blanqueador comercial (Cloralex[®]) y se mantuvieron en agitación en tres lapsos de 10 min cada uno, enjuagando con agua potable cada lapso (Figura 39B y C). Posteriormente se colocaron en una solución fungicida-bactericida, que consistió en 2.0 g L⁻¹ de Final Bacter[®] (sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de oxitetraciclina

6.0 %), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar[®] Gold (azoxistrobina 18 %) 400 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 3 % de sacarosa, durante 90 min en agitación (Figura 39D). Finalizado el proceso se enjuagaron con agua bidestilada. En estas condiciones el material vegetal se transfirió a la campana de flujo laminar para trabajar en condiciones asépticas.

En la campana de flujo laminar, las semillas se sumergieron en etanol 96° por un minuto, enjuagando con agua bidestilada esterilizada, para después colocarlas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.62 % (30 % v/v Cloralex[®]), más 0.02 % de Tween-20[®] por 20 min (Figura 39E). Por último, los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada, se retiró la testa y se mantuvieron en una solución antioxidante de PVP (polivinilpirrolidona) 400 mg L⁻¹, hasta la siembra (Figura 39F, G y H).

5.4 Preparación del Medio de Cultivo

5.4.1 Establecimiento

Los explantes fueron sembrados en tres medios de cultivo, MS (Murashige and Skoog, 1962), DCR (Gupta and Durzan, 1985) y GD (Gresshoff and Doy 1972), los cuales se adicionaron con vitaminas, mioinositol y sacarosa (Apéndice: Cuadros 1A, 2A y 3A) y se suplementaron con 9.06 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel[™]. Posteriormente se colocaron en cajas Magenta[™] de 250 mL y se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm⁻² de presión durante 15 min. Los cultivos se incubaron en total oscuridad a 24 ± 2 °C durante dos semanas.

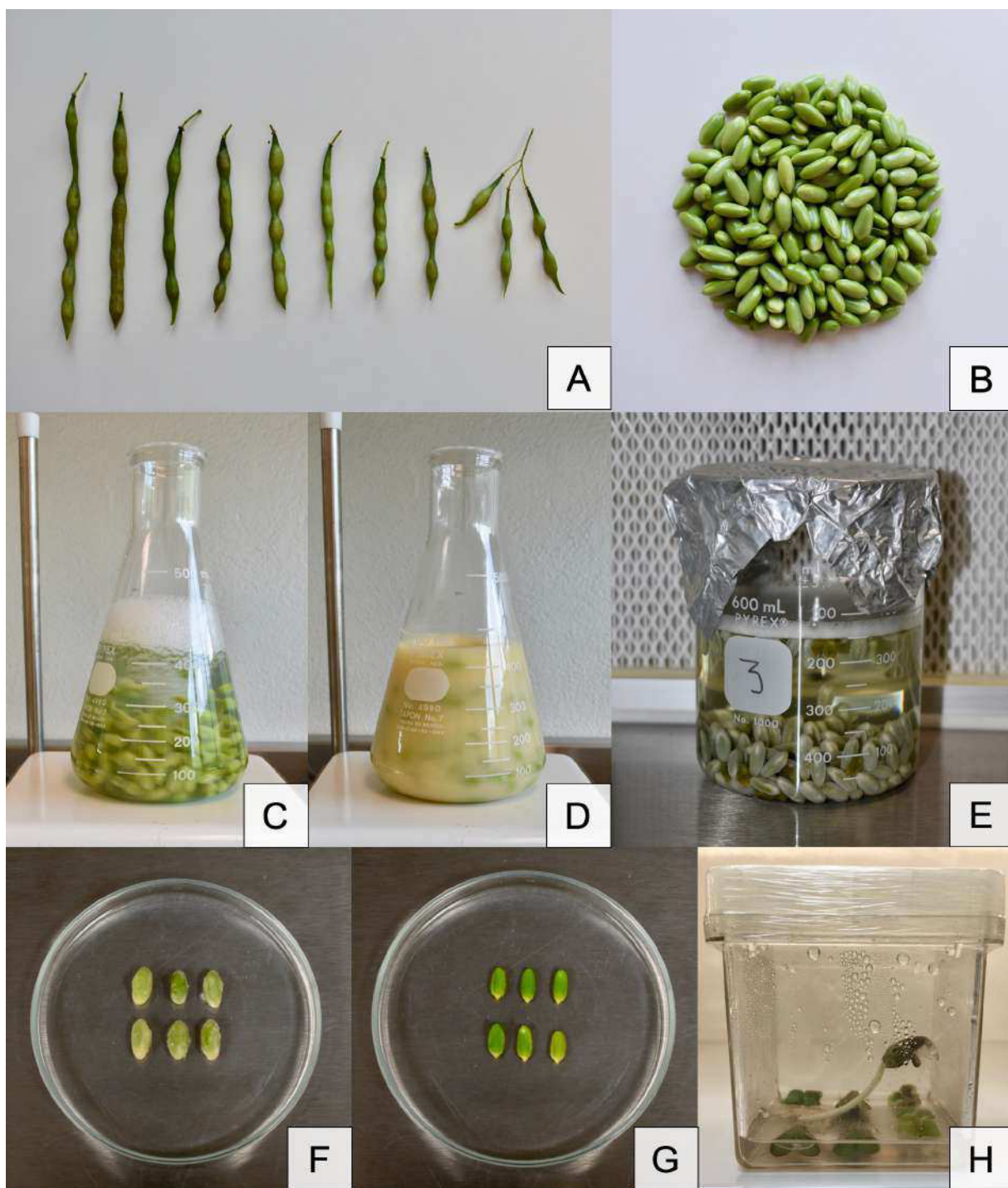


Figura 39. Proceso de desinfección de semillas de *P. aculeata*. A-B) Vainas y semillas inmaduras de retama; C) Lavado en agua potable y jabón líquido; D) Solución bactericida-fungicida; E) Inmersión en 1.62 % de NaClO y agua bidestilada; F-G) Eliminación de la testa de la semilla; H) Siembra *in vitro*.

5.4.2 Inducción de Callo *in vitro*

Plántulas *in vitro* de dos semanas se subcultivaron al medio de cultivo MS adicionado con los componentes descritos anteriormente y se suplementó con las concentraciones de 2.26, 4.53 y 6.79 μM de 2,4-D más la combinación con 2.22, 4.44 y 6.66 μM de 6-bencilaminopurina (BAP) y un control sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó como se describe anteriormente. Los medios se solidificaron con 4.5 g L^{-1} de Phytigel™, se colocaron en cajas Magenta™ y se esterilizaron bajo las condiciones indicadas. Los cultivos se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C durante cuatro y ocho semanas.

5.4.3 Proliferación de Callo *in vitro*

Después de la etapa de inducción, los callos se mantuvieron en proliferación en un medio MS adicionado con los componentes anteriormente indicados, más 4.07 μM de 2,4-D y 2.22 μM de BAP, durante 10 semanas con intervalos de subcultivo cada dos semanas, incubados bajo los mismos parámetros que la etapa de inducción.

5.5 Diseño Experimental

Para la etapa de establecimiento, el experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, con tres tratamientos y 12 repeticiones. Las variables que se evaluaron fueron los porcentajes de contaminación, oscurecimiento y callogénesis a cuatro semanas de la siembra.

La etapa de inducción se estableció también en un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y siete repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de callo *in vitro* a cuatro y ocho semanas después del subcultivo.

Para ambas etapas la unidad experimental fue una caja Magenta™. En la etapa de establecimiento se colocaron nueve semillas, mientras que en la inducción se colocaron cuatro semillas. Los porcentajes de contaminación, oscurecimiento y callogénesis de ambas etapas se transformaron mediante la función *Arcoseno*. En ambas etapas se realizó un análisis de varianza de un factor para evaluar los tratamientos. Finalmente, la comparación de medias se llevo a cabo mediante la prueba de Tukey $p \leq 0.05$ y los resultados se analizaron mediante el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento

El proceso de desinfestación utilizado en el establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras de *P. aculeata*, resulto efectivo en los tres medios utilizados. No se presento diferencia significativa (sig. $p \leq 0.05$) tanto en los porcentajes de contaminación como oscurecimiento (Cuadro 17). Estos valores fueron incluso menores a lo reportado por Gomes (2007), quien utilizando 0.6 % de NaClO presentó índices de contaminación de hasta 72 % en semillas de *P. aculeata* a 20 días de la siembra, así como valores de oscurecimiento de hasta 36 % en el mismo tiempo de evaluación. En especies de la Tribu Caesalpinieae como *Caesalpinia bonduc*, la exudación fenólica seguida de oscurecimiento y muerte del explante, es un problema común (Cheruvathur *et al.*, 2010), por lo que se recomienda el uso combinado de sulfato de adenina y PVP (Santosh Kumar *et al.*, 2012). En cambio, en la variable callogénesis se presento diferencia significativa (sig. $p \leq 0.05$) entre los diferentes medios de cultivo (Cuadro 17), donde el medio MS mostró valores superiores al 40 % en el tiempo evaluado. Es importante mencionar que, en los tres medios de cultivo, la germinación fue evidente, sin embargo, en ausencia de luz, el hipocótilo y epicótilo no presentaron un buen desarrollo, mientras que el callo formado presentó coloración amarilla, crema y verde claro (Figura 40A, B y C). A partir de estos resultados, se continuó trabajando con el medio MS en la etapa de inducción.

Cuadro 18. Efecto del medio de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y calogénesis en semillas inmaduras de *P. aculeata*, en la etapa de establecimiento a cuatro semanas de la siembra.

Tratamiento	% Contaminación	% Oscurecimiento	% Calogénesis
1 MS	10.41 ± 4.9 a	20.55 ± 7.1 a	49.44 ± 6.7 a
2 DCR	12.77 ± 5.8 a	15.69 ± 5.9 a	24.99 ± 8.2 ab
3 GD	17.91 ± 7.5 a	18.61 ± 6.6 a	21.1 ± 8.0 b

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

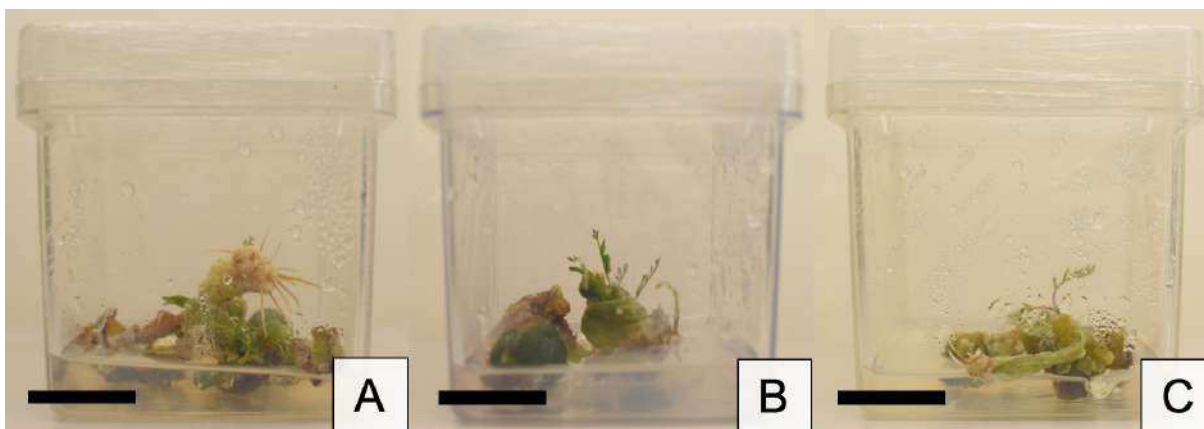


Figura 40. Efecto de los medios de cultivo en la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *P. aculeata*. A) MS; B) DCR; C) GD. Barras: 2.0 cm en A-C.

6.2 Inducción de Callo *in vitro*

Los explantes *in vitro* procedentes de la etapa de establecimiento se subcultivaron a los tratamientos de inducción de callo. En el tratamiento control no se inició la formación de callo en los tiempos establecidos, en cambio, sólo se presentó la germinación de la plántula con la extensión del hipocótilo, epicótilo y radícula (Cuadro 18, Figura 41A). Durante el primer mes de evaluación las concentraciones de 6.79 μM 2,4-D con 2.22 y 4.44 μM BAP y 4.53 μM 2,4-D con 6.66 μM BAP, promovieron la mayor formación de callo, mientras que con 2.26 μM 2,4-D con 4.44 μM BAP, los

valores no alcanzaron el 50 % de inducción (Cuadro 18). En tanto que durante el segundo mes de evaluación todos los tratamientos excepto el control, presentaron la formación de callo (Cuadro 18). La generación de callo inicio a la tercera semana después del subcultivo, empezando por la radícula y extendiéndose por hipocótilo, epicótilo y finalmente a los cotiledones (Figuras 41B-F y 42A-D). En algunos casos se presentó el crecimiento y desarrollo del meristemo apical, formando las primeras hojas verdaderas (Figuras 41B-C y E-F y 42A). En todos los tratamientos sin contar el control, los callos fueron de consistencia friable y desorganizados, con coloraciones desde marrón, verde claro, amarillo y crema (Figuras 41B-F y 42A-D). Estos resultados son contradictorios a lo sucedido en *C. pulcherrina*, ya que callogénesis ocurrió cuando el 2,4-D se utilizó solo o en combinación con kinetina y no con BAP (Rahman, *et al.*, 1993). No obstante, en *C. bonduc* las combinaciones 2,4-D/BAP sí fueron eficientes para la proliferación de callo en explantes radiculares (Santosh Kumar *et al.*, 2012). De la misma forma que esta investigación, Cheruvathur *et al.* (2010), no reportan la generación de callo en el tratamiento control, pero sí en aquellos donde el 2,4-D o ANA en concentraciones de hasta 1.0 mg L⁻¹ se combinan con BAP, en explantes de epicótilo de *C. bonduc*. Asimismo, Cheruvathur *et al.* (2012), coinciden en que la combinación 2,4-D/BAP es eficiente para la inducción de callo *in vitro*, indicando que la concentración de 6.0 mg L⁻¹ 2,4-D más 1.0 mg L⁻¹ BAP es la más eficiente para explantes de pulvino de *C. bonduc*.

Cuadro 19. Efecto de 2,4-D/BAP en la formación de callo *in vitro* en explantes de *P. aculeata*, a cuatro y ocho semanas del subcultivo.

Tratamiento	% Callogénesis			
	Primer mes		Segundo mes	
T1 Control	0.0 ± 0.0	c	0.0 ± 0.0	b
T2 2.26 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	90.5 ± 9.5	ab	90.5 ± 9.5	a
T3 2.26 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	47.6 ± 19.0	bc	69.0 ± 15.6	a
T4 2.26 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	80.9 ± 12.3	ab	90.4 ± 6.2	a
T5 4.53 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	78.6 ± 14.9	ab	92.9 ± 7.1	a
T6 4.53 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	70 ± 15.3	ab	70 ± 15.3	a
T7 4.53 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	100 ± 0.0	a	100 ± 0.0	a
T8 6.79 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	100 ± 0.0	a	100 ± 0.0	a
T9 6.79 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	100 ± 0.0	a	100 ± 0.0	a
T10 6.79 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	90.5 ± 9.5	ab	100 ± 0.0	a

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

‡Medias más error estándar.

6.3 Proliferación de Callo *in vitro*

Finalizada la etapa de inducción, los callos generados en los tratamientos se subcultivaron durante 10 semanas a medio de proliferación en intervalos de dos semanas. Durante este lapso, la mayor parte de los callos continuaron proliferando y presentaron oscurecimiento (Figura 43A y B). Además, otras unidades experimentales indujeron brotes a partir de los callos subcultivados (Figura 43A). Esta respuesta fue similar a lo reportado por Rahman *et al.* (1993), quienes obtuvieron la formación de brotes mediante la combinación BAP/ANA a partir de callos de *C. pulcherrina*. Mientras Cheruvathur *et al.* (2010; 2012) y Santosh Kumar *et al.* (2012), indujeron brotes utilizando conjuntamente BAP/AIA, en callos de *C. bonduc*.



Figura 41. Efecto de los tratamientos de inducción en semillas inmaduras de *P. aculeata* a ocho semanas del subcultivo. A) Germinación de semillas en medio sin reguladores; Formación de hipocótilo, epicótilo y callo en; B) 2.26/2.22 μM 2,4-D/BAP; C) 2.26/4.44 μM 2,4-D/BAP; D) 2.26/6.66 μM 2,4-D/BAP; E) 4.53/2.22 μM 2,4-D/BAP; F) 4.53/4.44 μM 2,4-D/BAP. Barras: 3.0 cm en A-F.

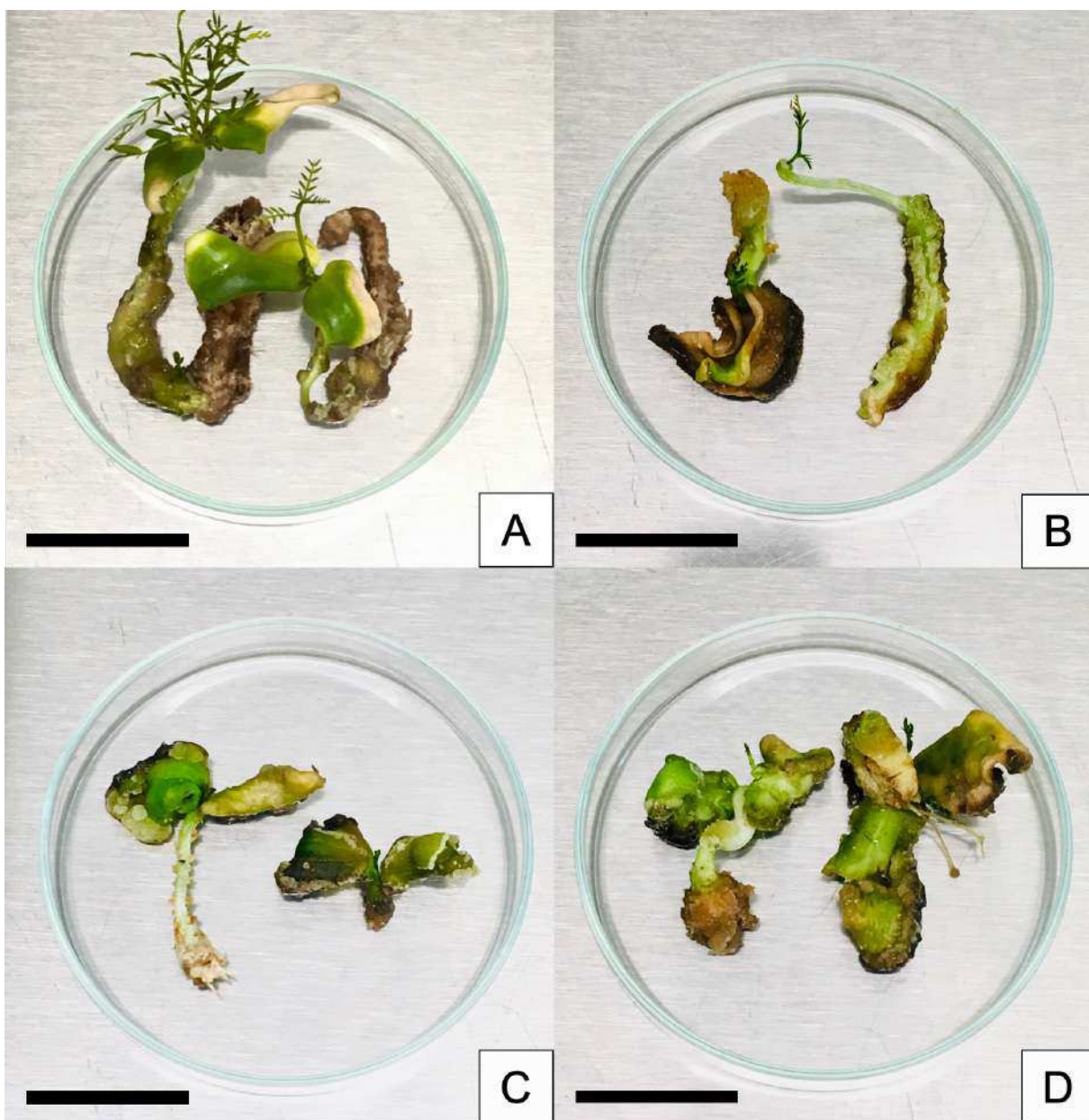


Figura 42. Efecto de los tratamientos de inducción en semillas inmaduras de *P. aculeata* a ocho semanas del subcultivo. Formación de callo en hipocótilo, epicótilo y cotiledones en; A) 4.53/6.66 μM 2,4-D/BAP; B) 6.79/2.22 μM 2,4-D/BAP; C) 6.79/4.44 μM 2,4-D/BAP; D) 6.79/6.66 μM 2,4-D/BAP. Barras: 4.0 cm en A-D.

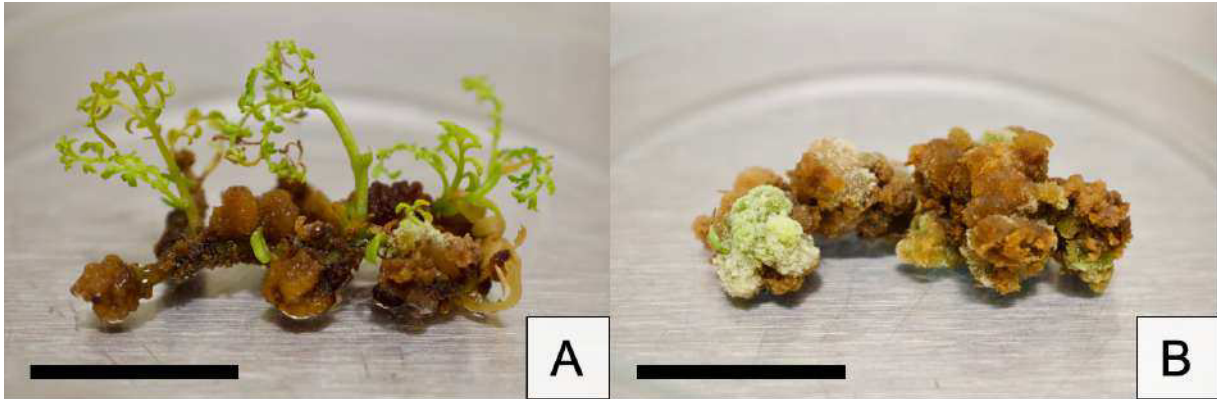


Figura 43. Efecto del medio de proliferación en explantes de *P. aculeata* a 10 semanas del subcultivo. A) Morfogénesis indirecta y oscurecimiento; B) Formación de callo friable y oscurecimiento. Barras: 2.0 cm en A y B.

7. CONCLUSIONES

1. En la etapa de establecimiento de semillas inmaduras de *P. aculeata*, el proceso de desinfestación permitió los mayores porcentajes de callogénesis en el medio MS.
2. En la etapa de inducción, las combinaciones de 2,4-D/BAP en medio MS, fueron efectivas para el desarrollo y proliferación de callo embriogénico, en los tiempos evaluados.
3. La etapa de proliferación permitió el desarrollo de los callos, así como la morfogénesis indirecta.

8. RECOMENDACIONES

Con base en las observaciones realizadas en la presente investigación, se realizan las siguientes recomendaciones:

1. Se sugiere utilizar semillas completamente inmaduras ya que, de acuerdo con los resultados, tienen un mejor potencial de adaptación a las condiciones *in vitro*.
2. En la etapa de establecimiento *in vitro*, se aconseja eliminar completamente la testa de las semillas, con la finalidad de reducir el oscurecimiento en el medio de cultivo.
3. La etapa de inducción se puede reducir a seis semanas, ya que la generación de callo inicia aproximadamente entre la tercera y cuarta semana y se evitaría el oscurecimiento de este.
4. Por otro lado, es recomendable incluir algún antioxidante como PVP o ácido ascórbico en el medio de proliferación, para reducir el oscurecimiento de los callos entre los subcultivos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, W. 2005. Propagación vegetativa de *Parkinsonia aculeata* L. por estaquillado. Quebracho. Revista de Ciencias Forestales 12:23-33.
- Alexander, H. D., J. Moczygemba and K. Dick. 2016. Growth and survival of thornscrub forest seedlings in response to restoration strategies aimed at alleviating abiotic and biotic stressors. Journal of Arid Environments 124:180-188.
- Ali, M., I. Azhar, Z. Amtul, V. U. Ahmad and K. Usmanhani. 1999. Antimicrobial screening of some Caesalpiniaceae. Fitoterapia 70:299-304.
- Almeida, C.F. C. B. R., T. C. Lima e Silva, E. L. C. Amorim, M. B. S. Maia and U. P. Albuquerque. 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). Journal of Arid Environments 62:127-142.
- Araújo, T. G., A. G. De Oliveira, J. F. Vecina, R. M. Marin, E. S. Franco, M. J. A. Saad and M. B. S. Maia. 2016a. *Parkinsonia aculeata* (Caesalpineaceae) improves high-fat diet-induced insulin resistance in mice through the enhancement of insulin signaling and mitochondrial biogenesis. Journal of Ethnopharmacology 183:95-102.
- Araújo, T. G., A. G. De Oliveira, J. F. Vecina, R. M. Marin, E. S. Franco, M. J. A. Saad and M. B. S. Maia. 2016b. Treatment with *Parkinsonia aculeata* combats insulin resistance-induced oxidative stress through the increase in PPAR γ /CuZn-SOD axis expression in diet-induced obesity mice. Mol Cell Biochem 419:93-101.

- Barroso, G. M., M. P. Morim, A. L. Peixoto e C. L. F. Ichaso. 1999. Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de Dicotiledôneas. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa. 443 p.
- Bewley, J. D. and M. Black. 1994. Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- Bhojwani, S. S. and P. K. Dantu. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India. 309 p.
- Bianchetti, A. e A. Ramos. 1982. Comparação de tratamentos para supercar a dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert. Boletim de Pesquisa Florestal 4:91-99.
- Céspedes-Flores, S. E. y E. Moreno-Sánchez. 2010. Estimación del valor de la pérdida de recurso forestal y su relación con la reforestación en las entidades federativas de México. Investigación ambiental 2(2):5-13.
- Cheruvathur, M. K., J. Britto and T. D. Thomas. 2010. Callus induction and shoot regeneration from epicotyl explants of ethnomedicinally important *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. Iranian Journal of Biotechnology 8(4):263-269.
- Cheruvathur, M. K., J. Britto and T. D. Thomas. 2012. Pulvinus: an ideal explant for plant regeneration in *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb., an important ethnomedicinal woody climber. Acta Physiol Plant 34:693-699.
- Correll, D. S. and M. C. Johnston. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Volume 6. Texas Research Foundation. Renner. Texas, USA. pp. 761-794.
- Divya, B., K. Mruthunjaya and S. N. Manjula. 2011. *Parkinsonia aculeata*: a phytopharmacological review. Asian J Plant Sci 10:175-181.

- FAO y CONAFOR (Food and Agriculture Organization y Comisión Nacional Forestal). 2011. Situación de los Recursos Genéticos Forestales en México. Informe Final del proyecto TCP/MEX/3301/MEX 4. 75 p.
- Foroughbakhch, R., J. L. Hernández-Piñero, M. A. Alvarado-Vázquez, E. Céspedes-Cabriales, A. Rocha-Estrada, and M. L. Cárdenas-Avila. 2009. Leaf biomass determination on Woody shrub species in semiarid zones. *Agroforest Syst* 77:181-192.
- George, E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. Plant propagation by Tissue Culture, 3rd ed. Volume 1. The Background. Springer, Netherlands. 501 p.
- Gomes, M. A. O. 2007. Germinação *in vitro* de *Parkinsonia aculeata* L.: uma espécie de uso múltiplo ocorrente nas matas ciliares da caatinga. Tesis de Maestría en Botánica. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. 47 p.
- Gresshoff P. M. and C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107:161-170.
- Gupta, P. K. and D. J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* 4:177-179.
- Hall, J. S., M. S. Ashton, E. J. Garen and S. Jose. 2011. The ecology and ecosystem services of native trees: Implications for reforestation and land restoration in Mesoamerica. *Forest Ecology and Management* 261:1553-1557.
- Hassan, S. W., R. A. Umar, A. A. Ebbo, A. J. Akpeji and I. K. Matazu. 2008. Hepatoprotective effect of leaf extracts of *P. aculeata* L. against CCl₄ intoxication in albino rats. *International Journal of Biological Chemistry* 2:42-48.

- Hundekari, G. I., S. S. Shahana, M. A. Shookur, S. Roohi and Z. S. Farooqi. 2012. Hepatoprotective activity of leaves of *Parkinsonia aculeata* L. against carbon-tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 3:879-889.
- Hussain, S. and B. Prasad. 1966. *In: Chopra, R. N. et al., Wealth of India Vol. 7.* New Delhi: Publication and Information Directorate, C.S.I.R.
- Santosh Kumar, S. R., V. Krishna, Venkatesh, K. Pradeepa, K. Girish Kumar and A. U. Gnanesh. 2012. Direct and indirect method of plant regeneration from root explants of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. – A threatened medicinal plant of Western Ghats. *Indian Journal of Experimental Biology* 50:910-917.
- Li, D. Z. and H. W. Pritchard. 2009. The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends Plant Sci* 14:614-621.
- Leite, A. C., T. G. Araújo, B. M. Carvalho, N. H. Silva, V. L. Lima and M. B. Maia. 2007. *Parkinsonia aculeata* aqueous extract fraction: biochemical studies in alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 111:547-552.
- Leite, A. C., T. G. Araújo, B. M. Carvalho, M. B. Maia and V. L. Lima, 2011. Characterization of the antidiabetic role of *Parkinsonia aculeata* (Caesalpineaceae). *Evid Based Complement Altern Med.*
- Little, E. L., F. H. Wadsworth y J. Marrero. 2001. Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. Segunda Edición. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. pp. 198-200.
- Marzouk, M. S., F. A. Moharram, R. A. El Dib and D. G. El-Hossary. 2013. Novel macrocyclic monoterpene glycosides from bioactive extract of *Parkinsonia aculeata* L. *Cell Biochem Biophys* 65:301-313.

- Mathur, J. and S. Mukunthakumar. 1992. Micropropagation of *Bauhinia variegata* and *Parkinsonia aculeata* from nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:119-121.
- Mohnot, K. and U. N. Chatterji. 1965. Chemico-physiological studies on the imbibition and germination of seeds of *Parkinsonia aculeata* Linn. Botany Department, Jodhpur University, India. pp. 576-585.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Ngangyo Heya, M., R. Maiti, R. Foroughbakhch, and A. Carrillo-Parra. 2017. *Biology, Productivity and Bioenergy of Timber-Yielding Plants. An Experimental Technology*. Springer International Publishing. 141 p.
- Novara, L. 1984. Las utilidades de los géneros de antófitos del nordeste del Valle de Lerma. Univ. Nac. De Salta, Argentina.
- Rahman, S. M., M. Hossain, B. K. Biswas, O. I. Joarder and R. Islam. 1993. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrina* through nodal bud culture of mature tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:363-365.
- Sharma, S., S. Sharma and A. P. Vig. 2016. Evaluation of antimutagenic and protective effects of *Parkinsonia aculeata* L. leaves against H₂O₂ induced damage in pBR322 DNA. *Physiol Mol Biol Plants* 22(1):17-31.
- Tewari, K, V. Singh and P. C. Gupta. 2005. A non-ionic water soluble seed-gum from *Parkinsonia aculeata*. *Carbohydrate Polymers* 59:393-396.
- Tinto, J. 1977. *Utilización de los Recursos Forestales Argentinos*. Instituto Forestal Nacional. Subsecretaría de Recursos Naturales Renovables y Ecología.

Ministerio de Economía. Secretaria de Estado de Agricultura y Ganadería.
Folleto técnico forestal 41:68.

USDA (United States Department of Agriculture). 2006. National Nutrient Database for Standard Reference. Online. Acceso: 22 de octubre de 2018. Disponible en:
<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=paac3>

Weber, E. 2003. Invasive plant species of the world: a reference guide to environmental weeds. CABI Publishing, Wallingford, UK.

APÉNDICE

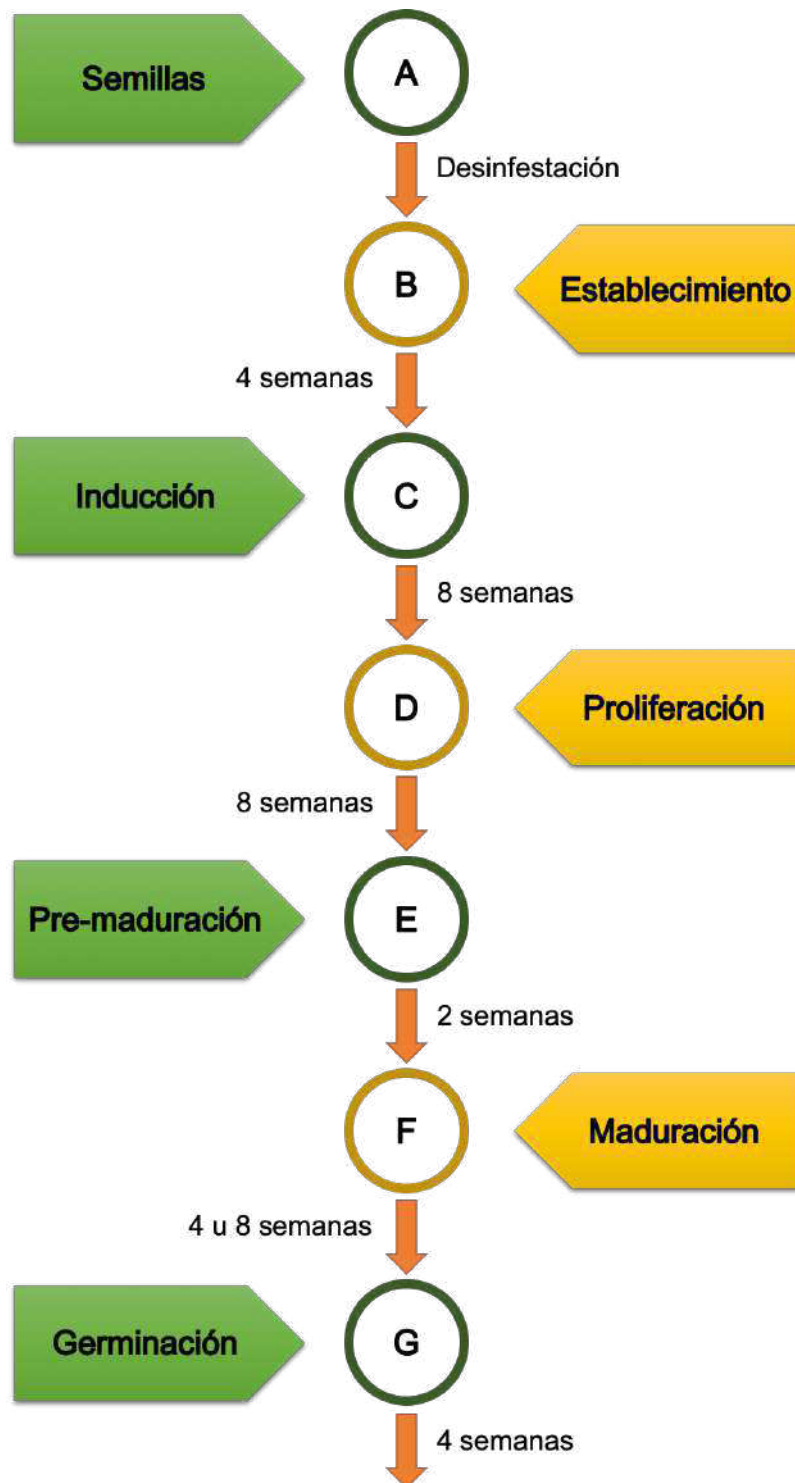


Figura 1A. Diagrama de pasos de la embriogénesis somática y regeneración *in vitro* de *E. ebano*. A) Explante inicial; B) Establecimiento *in vitro*; C) Inducción de callo embriogénico; D) Proliferación de callo embriogénico; E) Etapa de pre-maduración; F) Etapa de maduración; G) Germinación de embriones somáticos. Tiempo total: 7.5 u 8.5 meses.

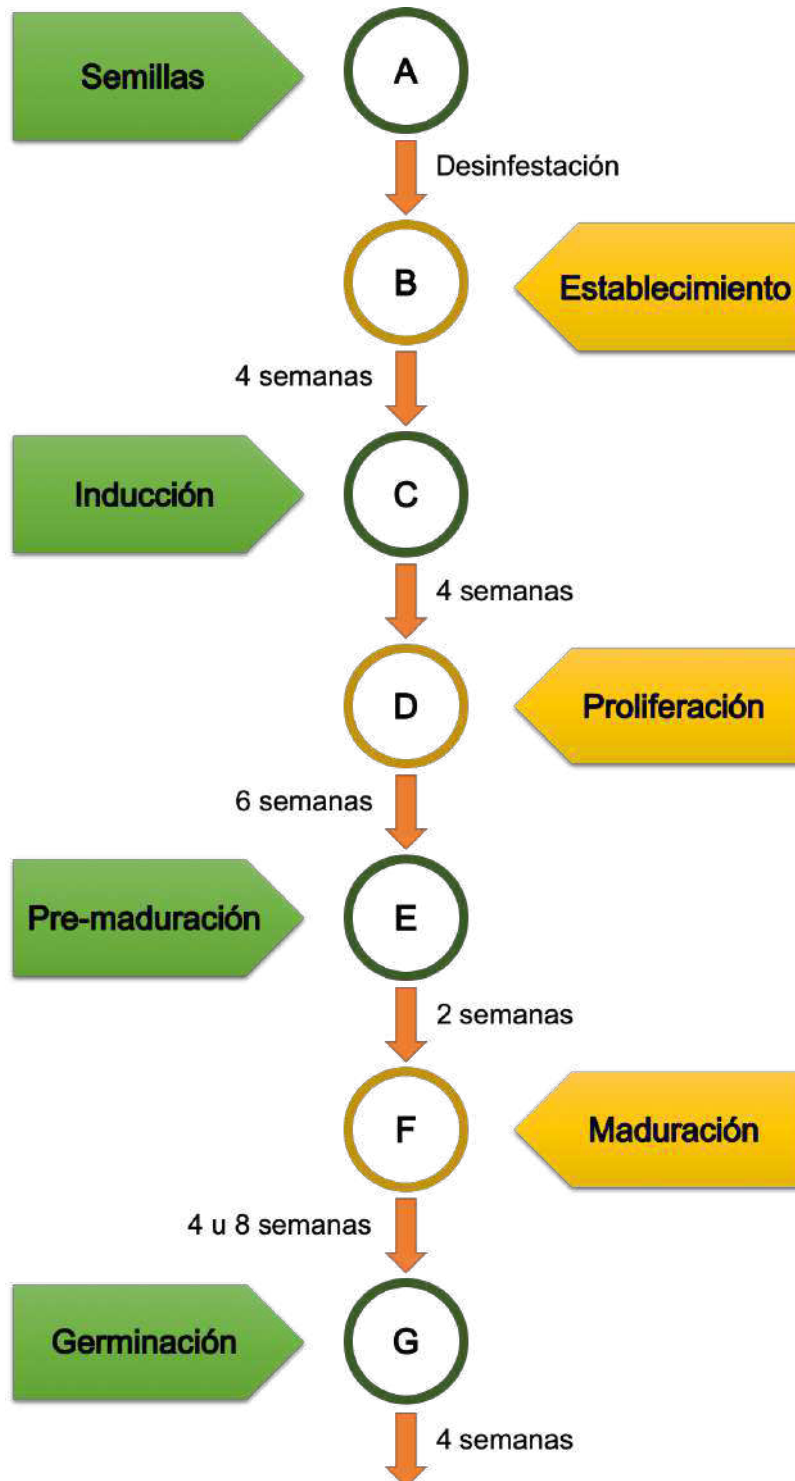


Figura 2A. Diagrama de pasos de la embriogénesis somática y regeneración *in vitro* de *V. farnesiana*. A) Explante inicial; B) Establecimiento *in vitro*; C) Inducción de callo embriogénico; D) Proliferación de callo embriogénico; E) Etapa de pre-maduración; F) Etapa de maduración; G) Germinación de embriones somáticos. Tiempo total: 6 o 7 meses.

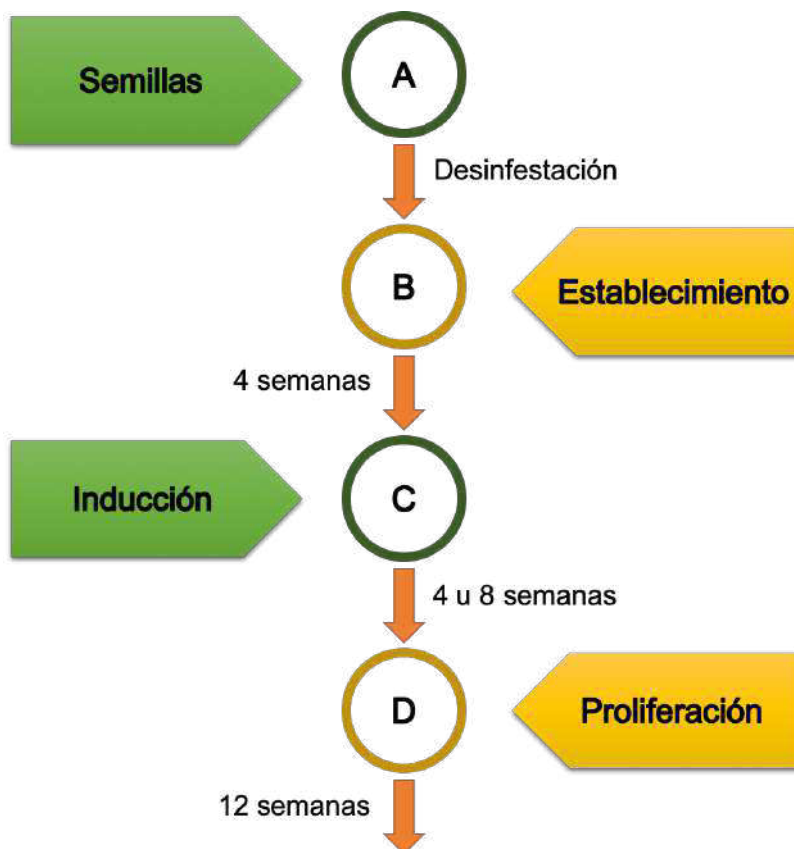


Figura 3A. Diagrama de pasos de la inducción de callo *in vitro* de *P. glandulosa*. A) Explante inicial; B) Establecimiento *in vitro*; C) Inducción de callo *in vitro*; D) Proliferación de callo. Tiempo total: 5 o 6 meses.

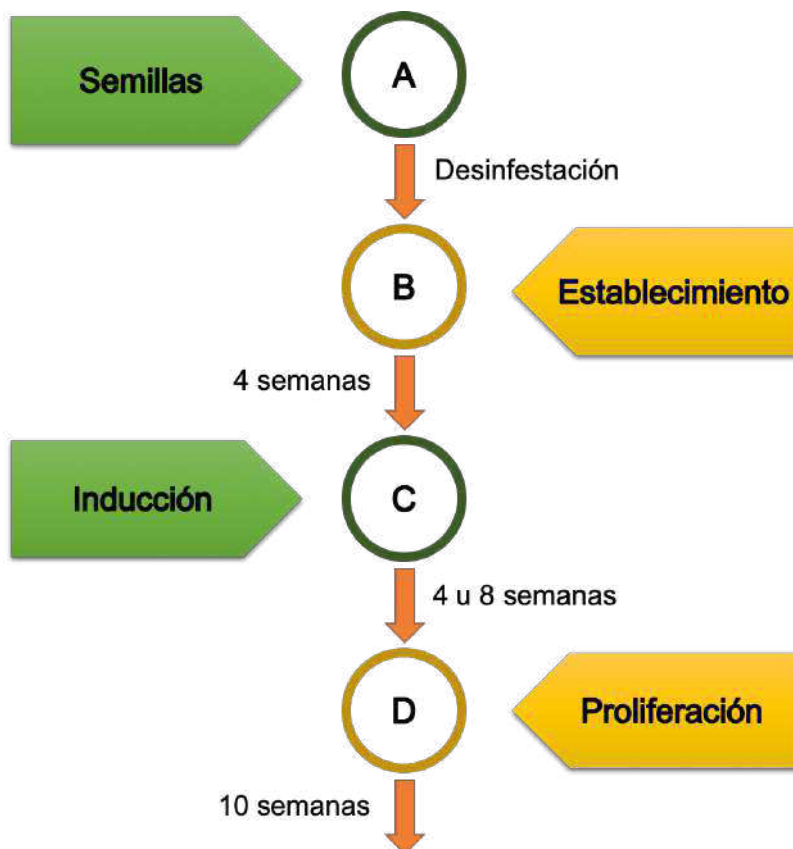


Figura 4A. Diagrama de pasos de la inducción de callo *in vitro* de *P. aculeata*. A) Explante inicial; B) Establecimiento *in vitro*; C) Inducción de callo *in vitro*; D) Proliferación de callo. Tiempo total: 4.5 o 5.5 meses.

Cuadro 1A. Componentes del medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962).

Componentes	Cantidad mg L ⁻¹
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	1650.000
KNO ₃	1900.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
ORGÁNICOS	
Mioinositol	100.000
Glicina	2.000
Ácido nicotínico	0.500
Piridoxina·HCl	0.500
Tiamina·HCl	0.100
Sacarosa	30000.000

Cuadro 2A. Componentes del medio de cultivo DCR (Gupta and Durzan, 1985).

Componentes	Cantidad mg L ⁻¹
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	400.000
KNO ₃	340.000
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	85.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.250
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
NiCl ₂	0.025
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
ORGÁNICOS	
Mioinositol	200.000
Glicina	2.000
Ácido nicotínico	0.500
Piridoxina·HCl	0.500
Tiamina·HCl	1.000
Sacarosa	30000.000

Cuadro 3A. Componentes del medio de cultivo GD (Gresshoff and Doy, 1972).

Componentes	Cantidad mg L ⁻¹
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	1000.000
KNO ₃	1000.000
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	208.810
KCl	65.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	17.090
KH ₂ PO ₄	300.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	0.300
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.000
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.300
KI	0.800
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
ORGÁNICOS	
Mioinositol	100.000
Glicina	4.000
Ácido nicotínico	1.000
Piridoxina·HCl	1.000
Tiamina·HCl	10.000
Sacarosa	20000.000

Cuadro 4A. Análisis de varianza del efecto de las concentraciones de NaClO, en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de *E. ebano*, a cuatro semanas de la siembra.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Contaminación	Entre grupos	2607.11	2	1303.55	4.58	0.019
	Dentro de grupos	7684.76	27	284.62		
	Total	10291.87	29			
Oscurecimiento	Entre grupos	2125.87	2	1062.93	4.68	0.018
	Dentro de grupos	6132.45	27	227.12		
	Total	8258.33	29			
Callogénesis	Entre grupos	53.83	2	26.91	0.11	0.892
	Dentro de grupos	6361.13	27	235.59		
	Total	6414.97	29			

Cuadro 5A. Análisis factorial del efecto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Concentración 2,4-D	14148.31	5	2829.66	2.55	0.031
Tipo de medio	5290.13	1	5290.13	4.78	0.031
Condición de incubación	6517.87	1	6517.87	5.89	0.017
Concentración x Tipo	17934.77	5	3586.95	3.24	0.009
Concentración x Condición	924.06	5	184.81	0.167	0.974
Tipo x Condición	39.69	1	39.69	0.036	0.850
Concentración x Tipo x Condición	4702.14	5	940.42	0.850	0.517
Error	132788.17	120	1106.56		
Total corregido	182345.17	143			

Cuadro 6A. Análisis de varianza del efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Callo embriogénico	Entre grupos	49556.99	23	2154.65	1.947	0.011
	Dentro de grupos	132788.17	120	1106.56		
	Total	182345.17	143			

Cuadro 7A. Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *E. ebano*, a cuatro semanas del subcultivo.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Embriones totales	Entre grupos	4156.46	9	461.82	7.407	0.000
	Dentro de grupos	24068.53	386	62.35		
	Total	28225.0	395			
Embriones cotiledonares	Entre grupos	58.52	9	6.5	3.497	0.000
	Dentro de grupos	717.72	386	1.85		
	Total	776.25	395			
Frecuencia de maduración	Entre grupos	15191.1	9	1687.9	4.160	0.000
	Dentro de grupos	156622.17	386	405.75		
	Total	171813.27	395			

Cuadro 8A. Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *E. ebano*, a ocho semanas del subcultivo.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Embriones totales	Entre grupos	38920.44	9	4324.49	7.607	0.000
	Dentro de grupos	219422.42	386	568.45		
	Total	258342.87	395			
Embriones cotiledonares	Entre grupos	311.56	9	34.61	6.568	0.000
	Dentro de grupos	2034.34	386	5.27		
	Total	2345.9	395			
Frecuencia de maduración	Entre grupos	7441.72	9	826.85	4.707	0.000
	Dentro de grupos	67810.86	386	175.67		
	Total	75252.58	395			

Cuadro 9A. Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de *E. ebano*, de los tratamientos de maduración.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Peso fresco	Entre grupos	15.74	9	1.75	6.788	0.000
	Dentro de grupos	18.04	70	0.25		
	Total	33.79	79			
Peso seco	Entre grupos	0.11	9	0.01	5.267	0.000
	Dentro de grupos	0.16	70	0.002		
	Total	0.27	79			
Contenido de humedad	Entre grupos	284.21	9	31.57	12.105	0.000
	Dentro de grupos	182.62	70	2.6		
	Total	466.83	79			

Cuadro 10A. Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de *E. ebano*, de los tratamientos control y con PEG de la etapa de maduración.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Peso fresco	Entre grupos	2.13	2	1.07	5.869	0.009
Control-PEG	Dentro de grupos	3.82	21	0.182		
	Total	5.96	23			
Peso seco	Entre grupos	0.002	2	0.001	0.368	0.697
Control-PEG	Dentro de grupos	0.047	21	0.002		
	Total	0.048	23			
Contenido de	Entre grupos	139.14	2	69.57	22.817	0.000
humedad	Dentro de grupos	64.03	21	3.04		
Control-PEG	Total	203.17	23			

Cuadro 11A. Análisis de varianza del efecto de BAP y AG₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de *E. ebano*, de cuatro semanas de maduración.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Porcentaje de	Entre grupos	6262.33	5	1252.46	1.801	0.122
germinación	Dentro de grupos	54924.62	79	695.24		
	Total	61186.95	84			

Cuadro 12A. Análisis de varianza del efecto de BAP y AG₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de *E. ebano*, de ocho semanas de maduración.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Porcentaje de	Entre grupos	19352.45	5	3870.49	4.269	0.001
germinación	Dentro de grupos	110616.5	122	906.69		
	Total	129968.97	127			

Cuadro 13A. Análisis de varianza del efecto de los medios de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de *V. farnesiana*, a cuatro semanas de la siembra.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Contaminación	Entre grupos	550.11	2	275.05	0.756	0.476
	Dentro de grupos	14913.53	41	383.74		
	Total	15463.63	43			
Oscurecimiento	Entre grupos	36026.81	2	18013.4	50.483	0.000
	Dentro de grupos	14629.7	41	356.82		
	Total	50656.51	43			
Callogénesis	Entre grupos	1645.22	2	822.61	4.124	0.023
	Dentro de grupos	8178.77	41	199.48		
	Total	9823.99	43			

Cuadro 14A. Análisis factorial del efecto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *V. farnesiana*, a cuatro semanas del subcultivo.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Concentración 2,4-D		412.34	3	137.44	0.147	0.931
Tipo de medio		16581.18	1	16581.18	17.788	0.000
Condición de incubación		2273.35	1	2273.35	2.439	0.123
Concentración x Tipo		7439.97	3	2479.99	2.660	0.056
Concentración x Condición		592.91	3	197.63	0.212	0.888
Tipo x Condición		222.28	1	222.28	0.238	0.627
Concentración x Tipo x Condición		1319.04	3	439.68	0.472	0.703
Error		59659.21	64	932.17		
Total corregido		88500.3	79			

Cuadro 15A. Análisis de varianza del efecto conjunto de la concentración de 2,4-D, tipo de medio de cultivo y condición de incubación, en la inducción de callo embriogénico en explantes de *V. farnesiana*, a cuatro semanas del subcultivo.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Callo embriogénico	Entre grupos	28841.09	15	1922.74	2.063	0.024
	Dentro de grupos	59659.21	64	932.17		
	Total	88500.3	79			

Cuadro 16A. Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*, a cuatro semanas del subcultivo.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Embriones totales	Entre grupos	24478.0	9	2719.82	11.932	0.000
	Dentro de grupos	87985.5	386	227.94		
	Total	112463.5	395			
Embriones cotiledonares	Entre grupos	83.78	9	9.31	3.502	0.000
	Dentro de grupos	1026.29	386	2.65		
	Total	1110.08	395			
Frecuencia de maduración	Entre grupos	478.35	9	53.15	2.832	0.003
	Dentro de grupos	7132.6	380	18.77		
	Total	7610.96	389			

Cuadro 17A. Análisis de varianza del efecto de los suplementos en el medio de cultivo en la etapa de maduración de embriones somáticos de *V. farnesiana*, a ocho semanas del subcultivo.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Embriones totales	Entre grupos	39565.89	9	4396.21	10.921	0.000
	Dentro de grupos	154980.12	385	402.54		
	Total	194546.01	394			
Embriones cotiledonares	Entre grupos	106.21	9	11.8	2.721	0.004
	Dentro de grupos	1674.21	386	4.33		
	Total	1780.43	395			
Frecuencia de maduración	Entre grupos	390.25	9	43.36	2.343	0.014
	Dentro de grupos	7050.65	381	18.5		
	Total	7440.91	390			

Cuadro 18A. Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de *V. farnesiana*, de los tratamientos de maduración.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Peso fresco	Entre grupos	1.11	9	0.12	1.763	0.091
	Dentro de grupos	4.91	70	0.07		
	Total	6.02	79			
Peso seco	Entre grupos	0.032	9	0.004	6.426	0.000
	Dentro de grupos	0.039	70	0.001		
	Total	0.070	79			
Contenido de humedad	Entre grupos	497.27	9	55.25	56.791	0.000
	Dentro de grupos	68.1	70	0.97		
	Total	565.37	79			

Cuadro 19A. Análisis de varianza del contenido de humedad en base al peso fresco y seco de callos embriogénicos de *V. farnesiana*, de los tratamientos control y con PEG de la etapa de maduración.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Peso fresco	Entre grupos	0.56	2	0.28	4.222	0.029
Control-PEG	Dentro de grupos	1.39	21	0.06		
	Total	1.95	23			
Peso seco	Entre grupos	0.014	2	0.007	7.802	0.003
Control-PEG	Dentro de grupos	0.019	21	0.001		
	Total	0.032	23			
Contenido de	Entre grupos	317.46	2	158.73	164.588	0.000
humedad	Dentro de grupos	20.25	21	0.964		
Control-PEG	Total	337.72	23			

Cuadro 20A. Análisis de varianza del efecto de BAP y AG₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de *V. farnesiana*, de cuatro semanas de maduración.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Porcentaje de	Entre grupos	3754.56	5	750.91	1.932	0.092
germinación	Dentro de grupos	57128.88	147	388.63		
	Total	60883.44	152			

Cuadro 21A. Análisis de varianza del efecto de BAP y AG₃ en el porcentaje de germinación de embriones somáticos de *V. farnesiana*, de ocho semanas de maduración.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Porcentaje de	Entre grupos	11005.92	5	2201.18	6.309	0.000
germinación	Dentro de grupos	42216.54	121	348.89		
	Total	53222.47	126			

Cuadro 22A. Análisis de varianza del efecto de los medios de cultivo en la callogénesis de semillas inmaduras de *P. glandulosa*, a cuatro semanas de la siembra.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Callogénesis	Entre grupos	4278.09	2	2139.05	5.110	0.017
	Dentro de grupos	7534.28	18	418.57		
	Total	11812.38	20			

Cuadro 23A. Análisis de varianza del efecto de 2,4-D/BAP en la inducción de callo *in vitro* en explantes de *P. glandulosa*, a cuatro y ocho semanas del subcultivo.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Callogénesis Primer mes	Entre grupos	50331.88	9	5592.43	6.302	0.000
	Dentro de grupos	62115.19	70	887.36		
	Total	112447.07	79			
Callogénesis Segundo mes	Entre grupos	53673.88	9	5963.76	7.495	0.000
	Dentro de grupos	55701.16	70	795.73		
	Total	109375.04	79			

Cuadro 24A. Análisis de varianza del efecto de los medios de cultivo en la contaminación, oscurecimiento y callogénesis de semillas inmaduras de *P. aculeata*, a cuatro semanas de la siembra.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Contaminación	Entre grupos	352.83	2	176.41	0.380	0.687
	Dentro de grupos	15334.91	33	464.69		
	Total	15687.75	35			
Oscurecimiento	Entre grupos	143.61	2	71.81	0.137	0.872
	Dentro de grupos	17235.55	33	522.29		
	Total	17379.17	35			
Callogénesis	Entre grupos	5661.46	2	2830.73	3.976	0.028
	Dentro de grupos	23493.84	33	711.93		
	Total	29155.31	35			

Cuadro 25A. Análisis de varianza del efecto de 2,4-D/BAP en la inducción de callo *in vitro* en explantes de *P. aculeata*, a cuatro y ocho semanas del subcultivo.

FV		SC	GL	CM	F	Sig.
Calogénesis	Entre grupos	72741.04	9	8082.33	10.373	0.000
Primer mes	Dentro de grupos	48306.98	62	779.14		
	Total	121048.03	71			
Calogénesis	Entre grupos	72962.12	9	8106.9	18.218	0.000
Segundo mes	Dentro de grupos	27590.32	62	445.0		
	Total	100552.45	71			