

Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul. "tipa colorada"

[Picloram effect on the induction of somatic embryogenesis in *Pterogyne nitens* Tul. "tipa colorada"]

Maritza Vacca Molina¹, Zulma Avilés¹, María Luisa Cristina Bonomo², y Lucía Díaz³

¹Cátedra de Fisiología Vegetal,
Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Salta, Argentina

²Cátedra de Introducción a la Biología,
Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Salta, Argentina

³Cátedra de Caña de Azúcar,
Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Agronomía y Zootecnia,
San Miguel de Tucumán, Argentina

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Somatic embryogenesis is the process where cells acquire somatic embryogenic competence under specific conditions and interesting tool for clonal propagation. The auxinic herbicide picloram is used as a growth regulator in the induction of callus formation. The "tipa colorada" (*Pterogyne nitens*) is a legume that belongs to a monospecific genus and is seriously threatened, making it a priority to develop protocols that will produce regeneration of elite material in quantity and quality. This study aimed to evaluate the effect of picloram in the induction of somatic embryogenesis in "tipa colorada", for which the Murashige and Skoog medium was used at 100 % of its salt formulation, supplemented with five concentrations of Picloram (0.82; 1.65; 2.48; 3.31 and 4.14 μ M). At 30 days, color, callus consistency and percent callus formation was evaluated. Character embryogenic callus was determined by microscopic analysis. It was possible to induce a 93.78 and 95.22 % of embryogenic callus creamy color, with picloram at concentrations of 3.31 μ M and 4.14 μ M respectively.

KEYWORDS: *Pterogyne*, picloram, embryogenesis, forestry, legume.

RESUMEN: La embriogénesis somática es el proceso donde las células somáticas adquieren competencia embriogénica bajo condiciones específicas y constituye una herramienta de interés para la propagación clonal. El picloram es un herbicida auxínico utilizado como un regulador de crecimiento en la inducción de callogénesis. La "tipa colorada" (*Pterogyne nitens*) es una leguminosa que pertenece a un género monoespecífico y se encuentra seriamente amenazada; por lo que es prioritario desarrollar protocolos de regeneración que permitan la obtención de material élite en cantidad y en calidad. El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en "tipa colorada", para lo cual se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog al 100% de su formulación salina, suplementado con cinco concentraciones de Picloram (0.82; 1.65; 2.48; 3.31 y 4.14 μ M). A los 30 días, se evaluó coloración, consistencia del callo y el porcentaje de formación de callos. El carácter embriogénico de los callos fue determinado mediante análisis microscópico. Se logró inducir un 93,78 y 95,22 % de callos embriogénicos de coloración cremosa, con picloram en concentraciones de 3.31 μ M y 4.14 μ M respectivamente.

PALABRAS-CLAVE: *Pterogyne*, picloram, embriogenesis, forestal, leguminosa.

1 INTRODUCCIÓN

El marco teórico y la experimentación dentro de la biotecnología vegetal, derivan del concepto de totipotencia celular, abordado por [1] y [2], quienes reconocen a la célula como la unidad primaria de todos los organismos vivos [3], [4]. El carácter totipotente de las células, permite que cualquier célula diferenciada que conserve su núcleo tenga la capacidad de regenerar una nueva planta por vía organogénica o embriogénesis somática (ES) [5], [6]. La ES es el proceso donde las células somáticas adquieren competencia embriogénica bajo condiciones específicas. En estas células se producen cambios morfológicos, fisiológicos, moleculares y bioquímicos que finalmente conducen a la formación del embrión somático. Se conocen dos tipos de ES, la ES directa y la indirecta. La ES directa se caracteriza por la inducción de embriones somáticos directamente de células sin la proliferación de callos, mientras que en la ES indirecta, los embriones somáticos se desarrollan a partir de callos embriogénicos friables [7], [8], [9]. La ES constituye una herramienta de interés para la propagación clonal, la producción de semillas sintéticas, la ingeniería genética y los programas de mejoramiento genéticos de las especies cultivadas [10], [11].

El tipo y el estado fisiológico del explanto y el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento utilizados constituyen uno de los tantos factores que determinan la adquisición de la competencia embriogénica de las células cultivada *in vitro*.

El ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico, conocido como picloram (Pic), es un herbicida auxínico del grupo de las piridinas, que posee propiedades similares a las auxinas naturales [12] y que se utiliza en bajas concentraciones como un regulador de crecimiento. Este compuesto es eficaz como inductor de la proliferación celular en el tejido y en el cultivo de células [13], [14], [15] [16].

La "tipa colorada" (*Pterogyne nitens*) pertenece al género *Pterogyne*, familia Fabaceae, subfamilia Caesalpinoideae. Su área de distribución geográfica abarca los países de Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Es un árbol que crece en ambientes húmedos y alcanza los 25 m de altura, esta especie de gran calidad maderera, es apta para ser utilizada en planes de forestación, reforestación o enriquecimiento de los bosques naturales del noroeste argentino, que han sufrido intensas explotaciones [17] [18]. En Brasil, la madera de *P. nitens* es utilizada en forma indiscriminada para la construcción civil. En consecuencia, por tratarse de un género monoespecífico, esta leguminosa se encuentra seriamente amenazada de extinción [19] [20]. Debido a la importancia económica, de conservación y difusión de esta especie es prioritario desarrollar protocolos de regeneración que permitan la obtención de material élite en cantidad y en calidad.

La embriogénesis somática ha sido reportada en varias especies, *Pinus pinea* [21]; *Quercus rubra* [22]; *Acrocomia aculeata* [23]; *Eucalyptus* [24]; *Cupressus sempervirens* [25]; *Melia azedarach* [26]; *Erythrina crista-galli*, *Acacia caven*, *Parkinsonia aculeata*, *Gleditsia amorphoides*, *Sesbania punicea* [27]; *Araucaria angustifolia* [28], etc. No se encontraron estudios que informen su aplicación en tipa colorada.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul. "tipa colorada".

2 METODOLOGÍA

2.1 MATERIAL VEGETAL Y DESINFECCIÓN

Para los distintos experimentos se emplearon frutos recolectados de la localidad de Orán (Salta, Argentina, 23°08'S 64°20'O) en el año 2012. Las semillas se extrajeron de frutos maduros, se desinfectaron mediante lavado en una solución de detergente y agua en agitación a una velocidad de 250 rpm durante 30 minutos, se enjuagaron con agua corriente. La desinfección superficial se completó en condiciones de asepsia, en cámara de flujo laminar, mediante el empleo de una solución de alcohol etílico al 70 % (v/v), durante 2 minutos, seguida de una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% (p/v) con el agregado de tres gotas de Tween 20® por litro de solución durante 10 minutos. Posteriormente, se enjuagó cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron incubadas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog [29] (MS) al 50% de su concentración salina (MS50), solidificado con 5 g/L de agar (Sigma ®), suplementado con 0,1 g/L de mio-inositol, vitaminas de MS y 30 g/L de sacarosa. El pH se ajustó a 7 antes del autoclavado y el medio se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión (PSi) a 121°C, durante 20 minutos.

A partir de plántulas obtenidas por germinación *in vitro* se seccionaron hojas cotiledonares, fuente de explantos en los ensayos realizados en el presente trabajo.

2.2 INDUCCIÓN DE CALLOS Y PROEMBRIONES SOMÁTICOS

Para la inducción de callos se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog [29] al 100% de su formulación salina, solidificado con 2 g/L de Phytigel (Sigma[®]), suplementado con 0,1 g/L de *myo*-inositol, 0,5 g/L de caseína hidrolizada (Sigma[®]) y 30 g/L de sacarosa (Neolab[®]). El medio de cultivo se suplementó con cinco concentraciones de Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico, Sigma[®] (Pic)), 0.82; 1.65; 2.48; 3.31 y 4.14 μ M. Además se contó con un tratamiento testigo sin Pic.

Las condiciones de pH y esterilización fueron las mismas que las descritas para la siembra de semillas *in vitro*. No se realizó desinfección de explantos, por provenir de condiciones asépticas. En cada unidad experimental se sembraron 6 explantos de 5 mm² de hoja cotiledonar. Los cultivos se incubaron en cámara de cría en oscuridad a 25±2 °C y se repicaron en los mismos medios cada 20 días.

A los 30 días, se evaluó la coloración del callo (blanco, blanco cremoso y marrón claro), la consistencia del callo (compacto, esponjoso, friable y friable nodular) y el porcentaje (%) de formación de callos. Se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA), con tres repeticiones. El análisis de la varianza se realizó con el programa Infostat [30], la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias del porcentaje de formación de callos.

2.3 ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

El carácter embriogénico de los callos fue determinado mediante análisis microscópico. Las muestras tomadas para microscopía electrónica fueron fijadas en FAA (35% paraformaldehído, ácido acético glacial - 70% etanol (1:1:9)(v/v/v) y deshidratadas, se les realizó secado por punto crítico CO₂ y fueron metalizadas con oro. Las observaciones y fotografías se realizaron con microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL modelo JSM 5480 LV perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional de Salta (LASEM).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo la formación de callo a partir de segmentos cotiledonares se observó después de 30 días de cultivo en los medios de inducción que contienen Pic, que es coherente con lo registrado en la ES de otras especies como embriones de maíz [31], [32], yuca [33], *Coffea canephora* var. robusta [34], *Cedrela fissilis*, *Cinnamomum pauciflorum* [35] y *Musa* spp. [36]. La adición de Pic en los medios de cultivos promovió la inducción de callo en explantos cotiledonares de "tipa colorada". Wahby [37], expresa que las auxinas tienen acción sobre la elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias. En otras especies como *Phyllanthus nodiflorus*, el Pic debe ser combinado con otras auxinas como 2,4-D para inducir la formación de callos embriogénicos [36].

La adquisición de la capacidad embriogénica de los callos puede estar relacionada con el establecimiento de un balance específico entre diferentes hormonas de tipo endógenas, la adición de Pic incrementó la capacidad de desarrollo embriogénico. Esto se puede atribuir a la presencia de células meristemáticas en el explante utilizado. La evaluación del comportamiento de las variables coloración, consistencia del callo y porcentaje de formación de callos (Tabla 1), sugiere la existencia de una acentuada diferencia del efecto concentración de Pic, sobresaliendo los tratamientos suplementados en concentraciones de 4.14 μ M y 3.31 μ M. El Pic promovió la inducción de callos de forma directamente proporcional conforme se incrementó la dosis. Alcanzó el máximo porcentaje de inducción (95.22 %) con 4.14 μ M, después de 4 semanas de cultivo. Similares observaciones fueron presentadas en *Heliconia* [36].

Tabla 1: Influencia de las diferentes concentraciones de Pic sobre las variables cuali y cuantitativas (B: blanco, BC: blanco cremoso, MC: marrón claro, C: compacto, E: esponjoso, F: friable, FN: friable nodular)

Denominación de los tratamiento : Concentración Pic	Coloración	Consistencia	% de formación de callos
P ₁ : 0.82 μ M	B	C	86,89 c
P ₂ : 1.65 μ M	B con MC	E	69,22 a
P ₃ : 2.48 μ M	BC	F- FN	76,78 b
P ₄ : 3.31 μ M	BC	FN	93,78 d
P ₅ : 4.14 μ M	BC	FN	95,22 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En los callos friables, friables-nodulares y de color blanco cremoso se observaron regiones embriogénicas y no embriogénicas (Fig. 1). En especies del género *Allium* el empleo de Pic generó callos altamente friables y de coloración cremosa, características que están asociadas a una mayor capacidad de regeneración de plantas [16].

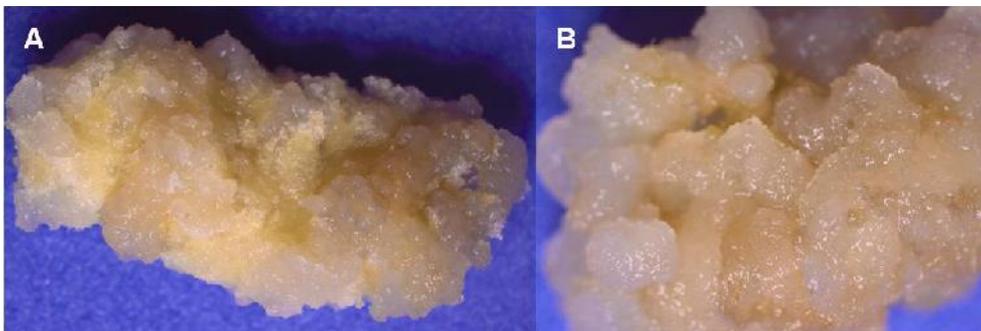


Figura 1: A) Apariencia y consistencia de callos friables inducidos con Pic 2.48 μM , B) Detalle de región embriogénica de callos friables-nodulares y de color blanco cremoso.

La región embriogénica está compuesta por células meristemáticas, isodiamétricas con citoplasma denso, pared celular delgada, con intensa actividad metabólica (gran cantidad de granos de almidón) (Fig. 2A). Las células alargadas son típicas de regiones no embriogénicas (Fig. 2B). Similares observaciones fueron informadas en ES de maíz [4].

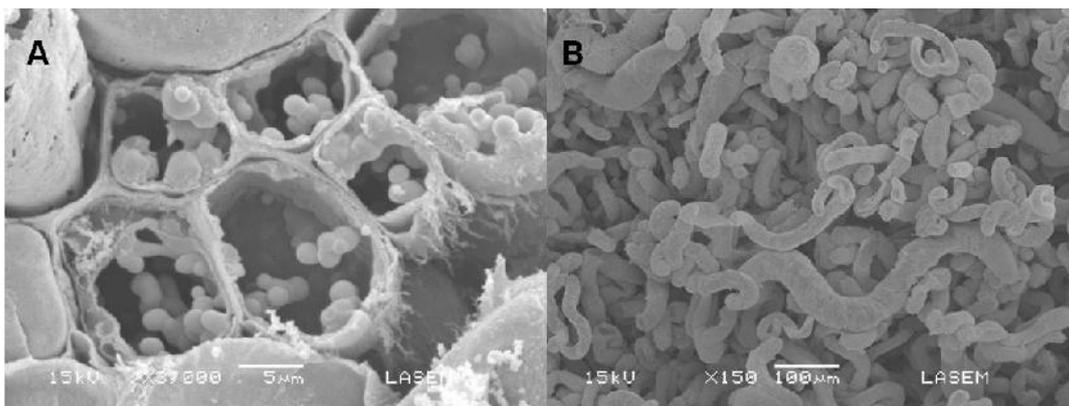


Figura 2: A) Tipo de células de región embriogénica en tratamientos con Pic a 4.14 μM , con presencia de granos de almidón, B) Células alargadas de callo no embriogénico con Pic a 0.82 μM .

La observación microscópica del callo embriogénico muestra en todos los estados una organización interna del callo, coincidiendo con lo observado por [4] en maíz. Las células meristemáticas en las capas externas se organizan en "clusters" de células embriogénicas para dar lugar a embriones somáticos, mientras que en el interior del callo se encuentran células parenquimáticas con grandes espacios intercelulares (Fig 3).

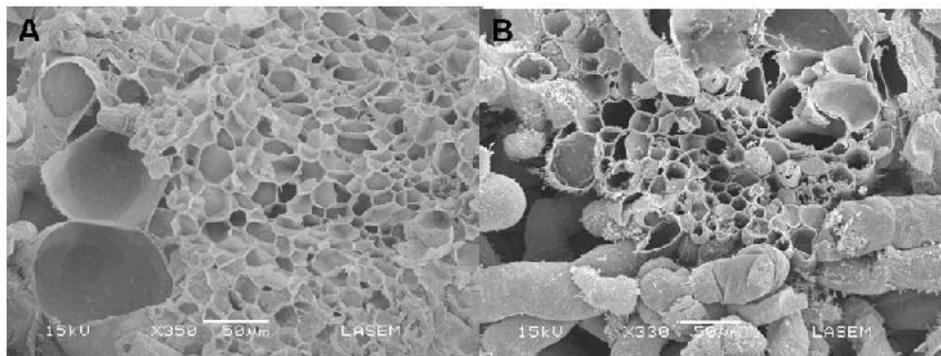


Figura 3: Organización dentro del callo de células meristemáticas en "cluster" tratados con Pic: A) 3.31 µM, B) 4.14µM.

Se plantea que la eficiencia del Pic en la inducción de callos es comparable a la del 2,4-D en cuanto a la inducción del crecimiento y superior a éste en cuanto a lograr la friabilidad de los callos y la subsiguiente regeneración de plantas, concordando con lo propuesto para *Allium cepa* y *Allium trifoliatum* subsp. *hirsutum* [16].

El Pic es una auxina sintética muy eficiente para el cultivo de tejidos vegetales, puesto que ofrece ciertas ventajas en relación con el 2,4-D por ser soluble en agua, menos tóxica por su efectividad a concentraciones más bajas y, por ofrecer un mayor potencial para la regeneración de plantas a partir de callos. Firoozabady y Moy [13] cita en *Ananas comosus* al Pic como un potencial agente embriogénico.

El empleo de Pic en el cultivo de tejido en "tipa colorada" no ha sido informado aún, los resultados de este trabajo son alentadores y resulta positivo contar con nuevas alternativas en la composición de fitorreguladores del medio de inducción de callos embriogénicos, especialmente tratándose de la sustitución del 2,4-D, ya que se conoce su efecto como agente desestabilizador de la dotación genética del material generado en el proceso de morfogénesis.

Se pudo observar que la incorporación del Pic en el medio de cultivo favoreció la formación de callo embriogénico en esta especie forestal.

4 CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se logró inducir *in vitro*, en explantes cotiledonares de "tipa colorada", un porcentaje del 93,78 y 95,22 % de callos embriogénicos de coloración cremosa, los cuales se cultivaron durante 30 días en oscuridad, en medios MS adicionados con Pic en las concentraciones de 3.31 µM y 4.14µM respectivamente.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta por el financiamiento del proyecto. A la Dra. Virginia Martínez por el apoyo brindado y permitir el uso de instrumental óptico.

REFERENCIAS

- [1] M. J. Schleiden, "Beitrage zue Phytogenesis", *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin*, n°13, pp. 137-176, 1938.
- [2] T. Schwann, "Mikroskopische Untersuchungen über die Ubereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Tiere und Pflanzen", W Engelmann: *Leipzig* No 176. 1839.
- [3] I. K. Vasil, "A short history of plant biotechnology", *Phytochemistry Reviews*, vol. 7, n° 3, pp. 387-394, 2008.
- [4] N. K. Dhillon and S. S. Gosal, "Histology of somatic embryos from maize embryo cultures", *Journal of Cell and Tissue Research*, vol. 13, n° 1, pp 3571-3576, 2013.
- [5] T. L. Reynolds, "Pollen embryogenesis", *Plant Molecular Biology*, vol. 33, n° 1, pp. 1-10, 1997.
- [6] A. M. Fortes and M. S. Pais, "Organogenesis from internode derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content", *American Journal of Botany*, vol. 87, n° 7, pp. 971-979, 2000.
- [7] V. M. Jiménez and F. Bangerth, "Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot", *Physiologia Plantarum*, vol. 111, n° 3, pp. 389-395, 2001.

- [8] F. R. Quiroz Figueroa, R. Rojas Herrera, R. M. Galaz Avalos and V. M. Loyola Vargas, "Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 86, n° 3, pp. 285-301, 2006.
- [9] D. M. Molina, M. E. Aponte, H. Cortina and G. Moreno, "The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 71, n° 2, pp. 117-123, 2002.
- [10] F. Quiroz Figueroa, C. Fuentes Cerda, R. Rojas Herrera and V. Loyola Vargas, "Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*", *Plant Cell Reports*, vol. 20, n° 12, pp.1141-1149, 2002.
- [11] P. Namasivayam, "Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 90, n° 1, pp. 1-8, 2007.
- [12] K. B. Kelley and D. E. Riechers, "Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 89, n° 1, pp. 1-11, 2007.
- [13] E. Firoozabady and Y. Moy, "Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis", *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, vol. 40, n° 1, pp. 67-74, 2004.
- [14] A. B. A Ahmed A. S. Rao, M. V. Rao and R. M. Taha, "Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyla nodiflora* (L.) Greene", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 54, n° 1, pp. 7-13, 2011.
- [15] R. Noormi, V. Murugaiyah and S. Subramaniam, "Optimization of callus induction medium for *Hymenocallis littoralis* (Melong kecil) using root and bulb explant", *Journal Medicine Plants Research*, vol. 6, n° 12, pp. 2309-2316, 2012.
- [16] A. Capote Rodríguez, F. Z. Mayor y O. Pérez Díaz, "Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa*, L.) cv. Caribe-71 regeneradas *in vitro*", *Biotecnología Aplicada*, vol. 17, pp. 241-246, 2000.
- [17] E. M. Del Castillo, M. N. Gil, M. Terán, S. Cravero y M. A. Zapater, "Tipa colorada": su autoecología. Resúmenes del primer taller internacional de recursos filogenéticos del noroeste Argentino, Salta, Argentina, 1.997.
- [18] M. J. Dimitri, R. F. Leonardis y J. S. Biloni, *El nuevo libro del árbol. Especies forestales de la Argentina oriental*. Tercera edición. Tomo II. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, 2.000.
- [19] L. Regasini, D. C. Fernandes, I. Castro Gamboa, D. H. Siqueira Silva, M. Furlan, V. da Silva Bolzani, E. J. Barreiro, E. Monteiro Cardoso Lopes, M. C. Marx Young, L. Brandão Torres, J. C. Rebuglio Velloso y O. Mascarenhas de Oliveira, "Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinoideae)", *Química Nova* vol. 31, n° 4, pp. 802-806, 2.008.
- [20] W. M. Oliveira do Nascimento, E. D. Cruz, M. H. Duarte Moraes y J. Machado Menten, "Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae Caesalpinoideae)", *Brasileira de sementes*, vol. 28, n° 1, pp. 149-153, 2.006.
- [21] E. Carneros, C. Celestino, K. Klimaszewska, Y. Park, M. Toribio and J. M. Bonga, "Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 98, pp. 165–178, 2009.
- [22] G. Vengadesan and P. M. Pijut, "Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 97, pp. 141–149, 2009.
- [23] E. Ferreira Moura, M. Contin Ventrella, S. Yoshimitsu Motoike, A. Q. de Sá Júnior, M. Carvalho and C. E. Manfio, "Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* vol. 95, pp.175–184, 2008.
- [24] G. Pinto, S. Silva, Y. S. Park, L. Neves, C. Araujo and C. Santos, "Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, doi:10.1007/s11240-008-9418-52008.
- [25] A. Giovanelli and A. Carlo, "Micropropagation of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.)", *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits Part 1*, pp. 93-105, doi: 10.1007/978-1-4020-6352-7_9, 2007.
- [26] S. Sharry, J. L. Cabrera Ponce, L. Herrera Estrella, R. M. Rangel Cano, S. Lede and W. Abedini, "An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry –tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis", *Electronic Journal of Biotechnology*, vol.9 n°3, Special Issue, by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso - Chile, 2006.
- [27] L. Marinucci, M. Ruscitti y W. Abedini, "Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina", *Revista de la Facultad de Agronomía*, La Plata, tomo 105, vol. 2, pp. 27-36, 2004.
- [28] A. L. Wendt dos Santos, V. Silveira, N. Steiner, M. Vidor and M. P. Guerra, "Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze)", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 45, n° 1, pp. 97 – 106, 2002.
- [29] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture", *Physiology Plant*, vol. 15, pp. 473-497,1962.
- [30] InfoStat. Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009.

- [31] X. Q. Huang and Z. M. Wei, "High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.)", *Plant Cell Reports*, vol. 22, n° 11, pp.793-800, 2004.
- [32] D. Z. Abebe, W. Teffera and J. S. Machuka, "Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation" *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, n° 13, pp. 2181-2186, 2008.
- [33] J. C. Ochoa, P. Chavarriaga y C. López, "Embriogénesis somática y producción de callo embriogénico friable de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)", *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, n° 2, pp. 20-27, 2012.
- [34] M. E. González, N. Santana y C. López, "Efecto de la composición del medio de cultivo y el genotipo en la inducción de la embriogénesis somática en clones de *Coffea canephora* p. var. Robusta", *Cultivos Tropicales*, vol. 22, n° 1, pp. 17-21, 2001.
- [35] P. M. Pijut, R. R. Beasley, S. S. Lawson, K. J. Palla, M. E. Stevens and Y. Wang, "In vitro propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001-2011)", *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 12, n° 1, pp. 25-51, 2012.
- [36] E. Hernández Meneses, M. C. G. López Peralta y A. A. Estrada Luna, "Calogénesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS in vitro: establecimiento, inducción y proliferación", *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 4, n° 8, pp. 1175-1186, 2013.
- [37] I. Wahby, *Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (Cannabis sativa L.): obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración in vitro*. Editorial de la Universidad de Granada, España, 2007.