



Morfogénesis *in vitro* de brotes adventicios del pinabete mexicano *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco

In vitro adventitious shoot morphogenesis of the Mexican Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco

Florencia García Campusano¹, Guadalupe Monjarás González², Gema Galindo Flores³, Alejandro Ponce Mendoza^{1,4}, Víctor Manuel Chávez Ávila⁵ y Judith Márquez Guzmán^{6*}

Abstract

Pseudotsuga menziesii is a conifer of ecological and economic importance worldwide. Due to the small size of its native populations in Mexico, natural regeneration in this species is poor, therefore *in vitro* cultivation is considered as an alternative strategy for its propagation and conservation. The effect of two combinations of auxins and cytokinins in the induction of adventitious shoots was compared. Mature embryos were grown on solid Schenk and Hildebrandt (SH) medium containing 0.53/13.32 μM of 1-naphthalene acetic acid (NAA) / 6-benzyladenine (BA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) / kinetin (K). The buds were formed via direct organogenesis in the hypocotyl and cotyledons. After 90 and 130 days of culture, the organogenic capacity was higher in NAA / BA and extended for a longer period than in 2,4-D / K, although the latter the shoots were more vigorous. Histological analysis showed the sequential appearance of distinct promeristemoids and meristemoids on the surface far from the medium, whereas wide meristematic zones and meristematic nodules formed in the tissues in contact with the medium, which gave rise to the outbreaks, was detected in both treatments. Because the buds formed included cells of the epidermis and embryonic subepidermis a multicellular origin is proposed. This work allowed us to better understand the events associated with direct organogenesis that may impact on the consolidation of regeneration protocols and future improvement strategies.

Key words: Auxins, caulogenesis, cytokinins, tissue culture, ontogeny, *Pseudotsuga*.

Resumen

Pseudotsuga menziesii es una conífera de importancia ecológica y económica a nivel mundial. Debido al reducido tamaño de sus poblaciones nativas en México, la especie enfrenta serias dificultades para su regeneración natural, por lo que el cultivo *in vitro* se plantea como estrategia alternativa para su propagación y conservación. Se comparó el efecto de dos combinaciones de auxinas y citocininas en la inducción de brotes adventicios. Se cultivaron embriones maduros en medio Schenk y Hildebrandt (SH) adicionado con 0.53/13.32 μM de ácido 1-naftalenacético (ANA)/ 6-benciladenina (BA) o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) / cinetina (K). Los brotes se formaron vía organogénesis directa en el hipocotilo y en cotiledones. Después de los 90 y 130 días de cultivo, la capacidad organogénica fue mayor en ANA/BA y se extendió por un período más largo que en 2,4-D/K, aunque este último los brotes fueron más vigorosos. Mediante un análisis histológico se detectó, en ambos tratamientos, la aparición secuencial de promeristemoides, meristemoides en la superficie alejada del medio, así como amplias zonas meristemáticas y nódulos meristemáticos en los tejidos en contacto con el medio, que dieron lugar a los brotes. Debido a que los brotes formados incluyeron células de la epidermis y subepidermis embrionaria se propone un origen multicelular. Este trabajo permitió comprender mejor los eventos asociados a la organogénesis directa que pueden impactar en la consolidación de los protocolos de regeneración y futuras estrategias de mejoramiento.

Palabras clave: Auxinas, caulogénesis, citocininas, cultivo de tejidos, ontogenia, *Pseudotsuga*.

Fecha de recepción/Reception date: 14 de marzo de 2019

Fecha de aceptación/Acceptance date: 17 de junio de 2019

¹Cenid-Comef, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.

²Instituto Tecnológico Superior de San Martín Texmelucan. México.

³Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.

⁴Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad en México. México.

⁵Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Jardín Botánico del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

⁶Departamento de Biología Comparada, Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

*Autor por correspondencia: judith.marquez@ciencias.unam.mx

Introducción

Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco, conocido en México como pinabete, es una conífera de importancia ecológica y económica, que se extiende desde Columbia Británica en Canadá hasta el centro de México (Hermann y Lavender 1990; Gugger *et al.*, 2011). En México, las poblaciones naturales de esta especie conforman el límite sur de su área de distribución y crecen en rodales pequeños y fragmentados (Vargas *et al.*, 2004). La distribución disyunta, aunado a la pérdida de bosques por cambio en el uso de suelo, ha reducido el número de individuos que participan en la reproducción, lo que ha resultado en una baja regeneración natural, por la baja producción y fertilidad de las semillas, así como de la tasa de reclutamiento de plántulas, y finalmente en altos niveles de endogamia en las poblaciones (Mápula *et al.*, 1996; Zavala y Méndez, 1996; Juárez *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2007), particularmente hacia el límite sur de su distribución: Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Oaxaca. Por ello, se le cataloga como especie sujeta a protección especial en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) (Semarnat, 2010), y se le considera especie prioritaria en los programas de conservación y reforestación en el país (Vargas *et al.*, 2004) que favorezcan su regeneración, así como alternativas para su aprovechamiento sustentable.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ofrece importantes perspectivas para la propagación de especies forestales. Las técnicas representan el fundamento de la investigación en la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma. No obstante, para las coníferas sigue siendo complicado y el éxito con frecuencia se restringe a genotipos particulares dentro de las especies (Bonga, 2015). La propagación de *P. menziesii* en esta modalidad se ha logrado mediante el uso de explantes originados de poblaciones nativas de Estados Unidos de América; se han obtenido diversos protocolos para la regeneración de brotes adventicios a partir del cultivo de embriones y cotiledones, por organogénesis directa (Cheng y Voqui, 1977; Cheah y Cheng, 1978) e indirecta (Winton y Verhagen, 1977), así como la proliferación y alargamientos de brotes apicales y axilares (Gupta y Durzan, 1985) y embriones somáticos (Durzan y Gupta, 1987).

Sin embargo, no ha sido posible transferir estos protocolos para la propagación *in vitro* de genotipos de procedencias mexicanas de la especie en cuestión, y el éxito a la fecha ha sido muy limitado. A partir del cultivo de embriones cigóticos maduros de semillas procedentes de dos poblaciones naturales en México (Tlaxco y Terrenate, en el estado de Tlaxcala), se logró obtener brotes adventicios al hacer doce combinaciones de los reguladores de crecimiento 6-benciladenina (BA) con ácido naftalenacético (ANA) y cinetina (K) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cuyas concentraciones abarcaron de 0 a 0.5 mgL⁻¹ de las auxinas y de 1 a 5 mg L⁻¹ de citocininas. El enraizamiento fue esporádico, lo que restringió la implementación de la tecnología de propagación a mayor escala (Galindo *et al.*, 2000). Posteriormente, se llegó a la formación de callo y estructuras de tipo embrionario a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros, aunque no mostraron evidencias histológicas, ni el desarrollo de plántulas a partir de ellas (Carrillo *et al.*, 2011). La amplia variabilidad en la respuesta morfogénica demuestra que aún se conoce muy poco acerca de la interacción de los diferentes factores del cultivo en la respuesta morfogénica de los explantes, en particular en lo que respecta a la naturaleza de los reguladores de crecimiento.

Debido al interés por consolidar un sistema de propagación *in vitro* que permita la regeneración de genotipos mexicanos de *P. menziesii*, en el presente trabajo se buscó caracterizar y comparar la respuesta morfogénica de embriones cigóticos maduros expuestos a dos combinaciones de reguladores de crecimiento; se evaluó la capacidad para inducir brotes adventicios, así como el patrón de desarrollo de los mismos respecto al tipo de tejido involucrado y el efecto de su distancia con el medio de cultivo. Mediante un análisis estructural se logró profundizar en la comprensión del origen y de los eventos celulares que ocurren previos a la diferenciación de los brotes, y que sirven para explicar el efecto que tienen los reguladores de crecimiento en mantener la capacidad organogénica.



Materiales y Métodos

Procedencia del material biológico

Se utilizaron 200 semillas maduras de *P. menziesii* donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Este material se recolectó en bosques de Terrenate, Tlaxcala de un número indeterminado de árboles en 1996. Se almacenaron en bolsas de plástico en un cuarto frío a 4 °C hasta su uso.

Pretratamiento de las semillas

Las semillas se limpiaron y desinfectaron bajo condiciones asépticas mediante su inmersión en: 1) H₂O₂ al 30 % (v/v) durante 60 min; 2) Benomyl (0.5 g L⁻¹) durante 24 h; Cloranfenicol (20 mg L⁻¹) por 45 min; 3) cloro comercial al 15 % (v/v) (6 % NaOCl) por 60 min; 4) en H₂O₂ al 1 % (v/v) por 48 h. Entre cada paso, las semillas se enjuagaron tres veces con abundante agua destilada estéril. Bajo condiciones de asepsia se eliminó la cubierta seminal y se extrajeron los megagametofitos, los cuales se enjuagaron con una solución de cloro comercial al 15 % (v/v) por 60 segundos, seguido de tres enjuagues en agua destilada estéril, antes de disectar el embrión. Previo a la siembra de los embriones, se sumergieron en una solución de cloranfenicol (60 mg L⁻¹).

Inducción de brotes adventicios

Este procedimiento se basó en el protocolo descrito por Galindo *et al.* (2000). Se utilizó medio SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), solidificado con Phytigel[®] (0.6 %) y con una de dos combinaciones de reguladores de crecimiento: ANA/BA y 2,4-D/K a 0.53/13.32 µM. El pH del medio se ajustó a 5.7-5.8, antes de esterilizar a 1.5 kg/cm², 121 °C, 15 min en una autoclave *Felisa* FE-399. Los embriones cigóticos maduros se acomodaron de forma horizontal en cajas de Petri y se incubaron por 30 días en una cámara de crecimiento *Forma Scientific* modelo 3740, a 23 ± 1 °C, con un

fotoperíodo de 16 h luz y 8h de oscuridad, a una PPFD de 46-48 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Para ambos tratamientos se pusieron diez embriones por caja de Petri con tres repeticiones.

Desarrollo y elongación de brotes adventicios

Después del período de inducción, los embriones se transfirieron a un medio de elongación, sin reguladores de crecimiento, el cual consistió de medio SH reducido al 50 % de su concentración de componentes inorgánicos, suplementado con sacarosa (3 g L⁻¹), polivinilpirrolidona (PVP) (250 mg L⁻¹), agente antivitrificante (0.5 g L⁻¹) (SIGMA) y fue solidificado con Phytigel® (0.6 %). Se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas. Se realizaron subcultivos quincenales durante seis meses y se individualizaron los brotes una vez que rebasaron una longitud de 0.5 mm, los cuales se resembraron sobre el mismo medio.

Análisis estructural

Con fines descriptivos, se tomó como referencia inicial al embrión maduro y su posición horizontal sobre el medio de cultivo, a partir del cual se definieron las siguientes zonas: superficie del embrión en contacto directo con el medio (SCM), superficie del embrión más alejada del medio (SAM): cotiledones (cot), el hipocotilo (hcot), el meristemo apical y la cofia.

Se analizaron de 5 a 10 embriones de cada tratamiento a los 0, 3, 6, 10, 12, 14, 16, 22, 30, 45 y 90 días de cultivo, mismos que se fijaron en formaldehido: ácido acético (FAA): alcohol: agua destilada, 10:5:50:35) durante un mínimo de 48 h. Posteriormente, el material se enjuagó en agua destilada y se deshidrató de manera gradual en una serie de diluciones de alcohol etílico (al 30, 50, 70, 85, 96 y 100 %), y con la aplicación de cambios cada hora.

Para la infiltración con Paraplast®, las muestras se sumergieron en xilol durante 10 min y luego se transfirieron gradualmente a mezclas de xilol-Paraplast en

proporciones de 3:1, 1:1 y 1:3, durante una hora cada una. Finalmente, se colocaron en Paraplast puro durante un mínimo de 24 h a 56 °C, para luego proceder a la inclusión. El tejido se seccionó a 6-8 μm con un microtomo de rotación *American Optical* 820 y después se tiñeron con safranina-verde rápido.

Análisis de datos

El número de brotes por embrión y formación de brotes de acuerdo a las zonas determinadas se evaluó a los 90 y 130 días. Los datos se analizaron mediante un GLM con una distribución de familia *quasi Poisson*. Para el GLM se utilizó la función 'glm'. El análisis *Post-hoc* de *Tukey* para los modelos de GLM se hizo con la función 'glht' del paquete 'multcomp'. Todos los análisis se hicieron mediante el programa R 2.14.0 (R Development Core Team, 2011).

Resultados

Al evaluar la respuesta de los explantes a los dos tratamientos, no se encontraron diferencias en el número de embriones que respondieron ($P < 0.05$): en ANA/BA, 75.8 % formaron brotes, mientras 73.7 % lo hicieron con 2,4-D/K (Cuadro 1). Para ambos tratamientos, el número de brotes con primordios foliares claramente diferenciados aumentó en el transcurso de 90 a 130 días, aunque solo fue significativamente mayor en los tratamientos con ANA/BA ($P < 0.05$), en los que el promedio de nueve brotes que se observó en inicio, se duplicó a los 130 días (Cuadro 1); en contraste, en 2,4-D/K, prácticamente no se incrementaron a través del tiempo ($P < 0.05$).



Cuadro 1. Promedio de brotes adventicios formados a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco después de 90 y 130 días tratados con 0.53/13.32 μM de ANA/BA o 2,4-D/K.

Tratamiento	Embriones con brotes (%)	Número de brotes/embrión (\pm EE ¹)		Brotes/hipocotilo (\pm EE)		Brotes /cotiledones (\pm EE)	
		90 días	130 días	90 días	130 días	90 días	130 días
ANA/BA	75.8	9.1 \pm 0.8 A	16.2 \pm 1.4 A*	4.1 \pm 0.45 ab*	7.8 \pm 0.7 a*	5 \pm 0.45 a	8.4 \pm 0.8 a*
2,4-D/K	73.7	5.9 \pm 0.44 B	7 \pm 0.36 B*	3.12 \pm 0.4 bc	3.80 \pm 0.25 b	2.7 \pm 0.2 c	3.4 \pm 0.22 b*

¹ = Error estándar. Letra mayúscula indica diferencias significativas en el número de brotes entre los tratamientos en un tiempo determinado ($p < 0.05$). Letras en minúscula indican diferencias significativas entre las regiones del embrión y el tratamiento con reguladores de crecimiento a un tiempo determinado ($P < 0.05$);

* = Incremento significativo en el número de brotes a través del tiempo en un tratamiento a un tiempo determinado ($P < 0.05$).

Tanto los cotiledones como el hipocotilo aportaron un número similar de brotes, aunque en ANA/BA se contabilizaron más ($P < 0.05$). No obstante, los brotes formados a partir de embriones tratados con 2,4-D/K tuvieron una apariencia más vigorosa, al alargarse más rápidamente (Figura 1A y 1B).



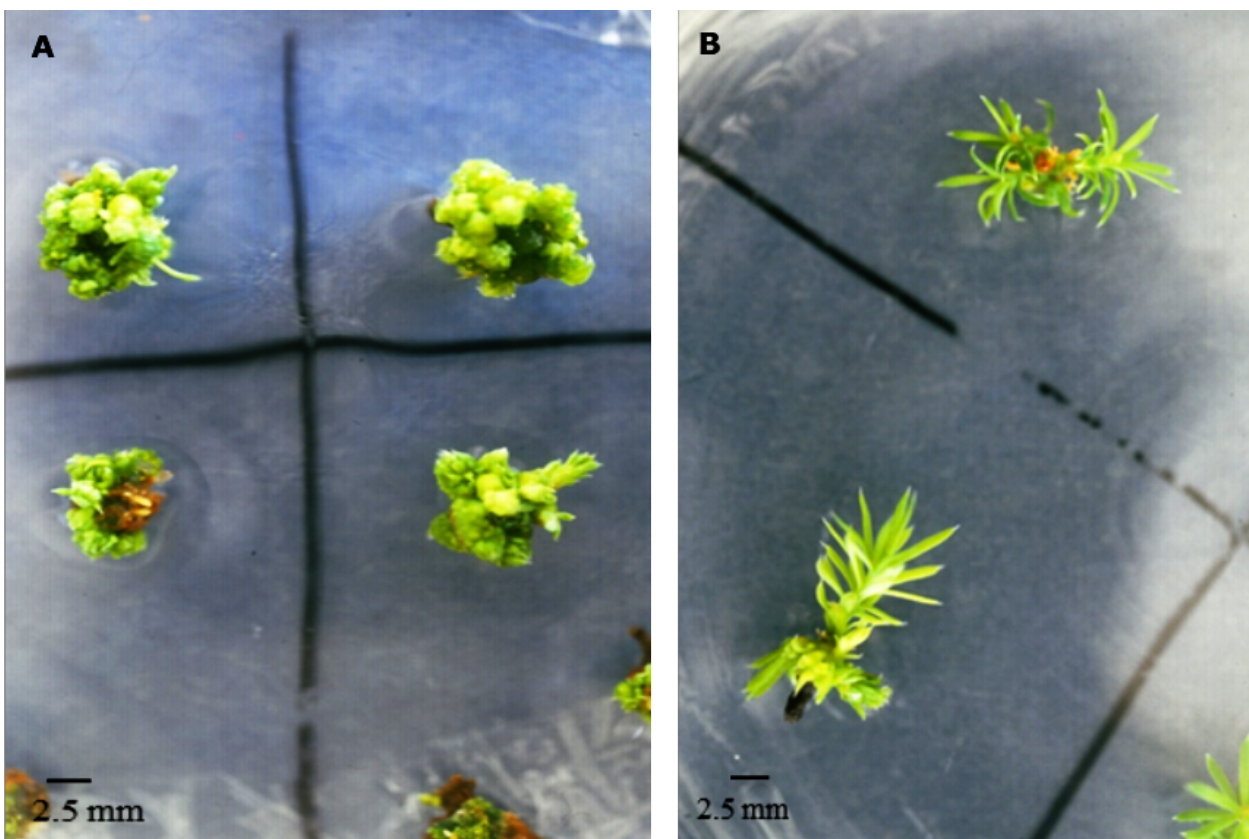


Figura 1. Brotes adventicios formados después de 130 días de cultivo tratados con 0.53/13.32 μM de A) ANA/BA, o B) 2,4-D/K.

Por otra parte, se comparó el efecto de la distancia de los tejidos embrionarios sobre el medio de cultivo en su respuesta morfogénica. Se observó que el número de brotes adventicios formados a partir de los cotiledones e hipocotilo de la SCM fue similar para ambos tratamientos; aproximadamente 37 % de los brotes que se desarrollaron en ANA/BA y 53 % en 2,4-D/K se iniciaron de esta superficie. En ANA/BA se obtuvo un número significativamente mayor a partir de los tejidos de la SAM ($P < 0.05$) (Cuadro 2).



Cuadro 2. Influencia de la distancia del tejido del medio de cultivo sobre el número promedio de brotes formados en cotiledones e hipocotilo de embriones maduros de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, a los 90 días de cultivo.

Tratamiento de inducción	Número promedio de brotes /hipocotilo (± DE)	Número promedio de brotes /cotiledones (± DE)
Superficie en contacto con el medio (SCM)		
ANA/BA	1.63 ± 0.24 B	1.65 ± 0.19 B
2,4-D/K	1.44 ± 0.20 B	1.77 ± 0.18 B
Superficie alejada del medio (SAM)		
ANA/BA	2.43 ± 0.29 A	3.36 ± 0.34 A
2,4-D/K	1.67 ± 0.13 B	1.00 ± 0.07 B

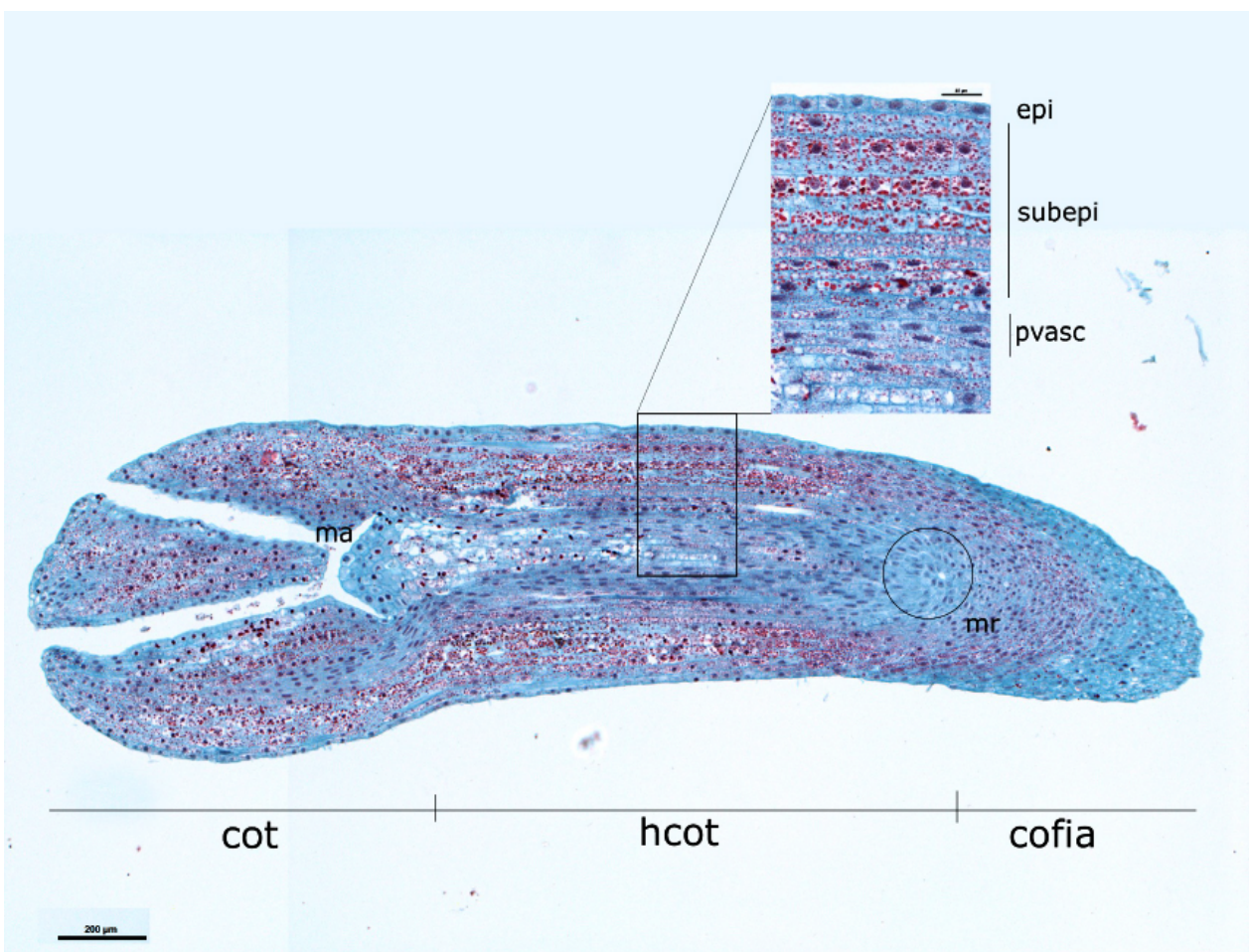
Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre todos los valores (tratamiento y superficie por tratamiento) ($P < 0.05$).

Análisis histológico

El estudio histológico de los explantes a distintos tiempos de cultivo mostró su origen adventicio por organogénesis directa. Si bien el patrón de desarrollo fue similar, la temporalidad de la aparición de las diferentes estructuras difirió entre los tratamientos y tipos de tejidos (cotiledones vs. hipocotilo), y fue más tardía en 2,4-D/K y en los cotiledones. Frecuentemente se observó la reactivación del meristemo apical del embrión a partir del cual se diferenció una yema apical, mientras que la cofia se hipertrofió y con el tiempo degeneró.

Los cortes longitudinales de los embriones al momento de ser sembrados (Figura 2) evidenciaron que la epidermis tiene un solo estrato de células rectangulares, aplanadas longitudinalmente, que rodean al tejido fundamental y a los haces provasculares centrales. Las

células del tejido fundamental son parenquimáticas, cúbicas, dispuestas ordenadamente a lo largo del eje, con pocos espacios intercelulares, núcleo conspicuo, citoplasma denso; mientras que la región del tejido provascular presentó células nucleadas con forma alargada. Ambos tipos celulares contenían abundante material de reserva. El meristemo apical del brote tiene la forma característica de domo, conformado por células isodiamétricas, densamente citoplásmicas, de núcleo prominente. En esta etapa, no se observó actividad mitótica en ninguna de las regiones mencionadas.

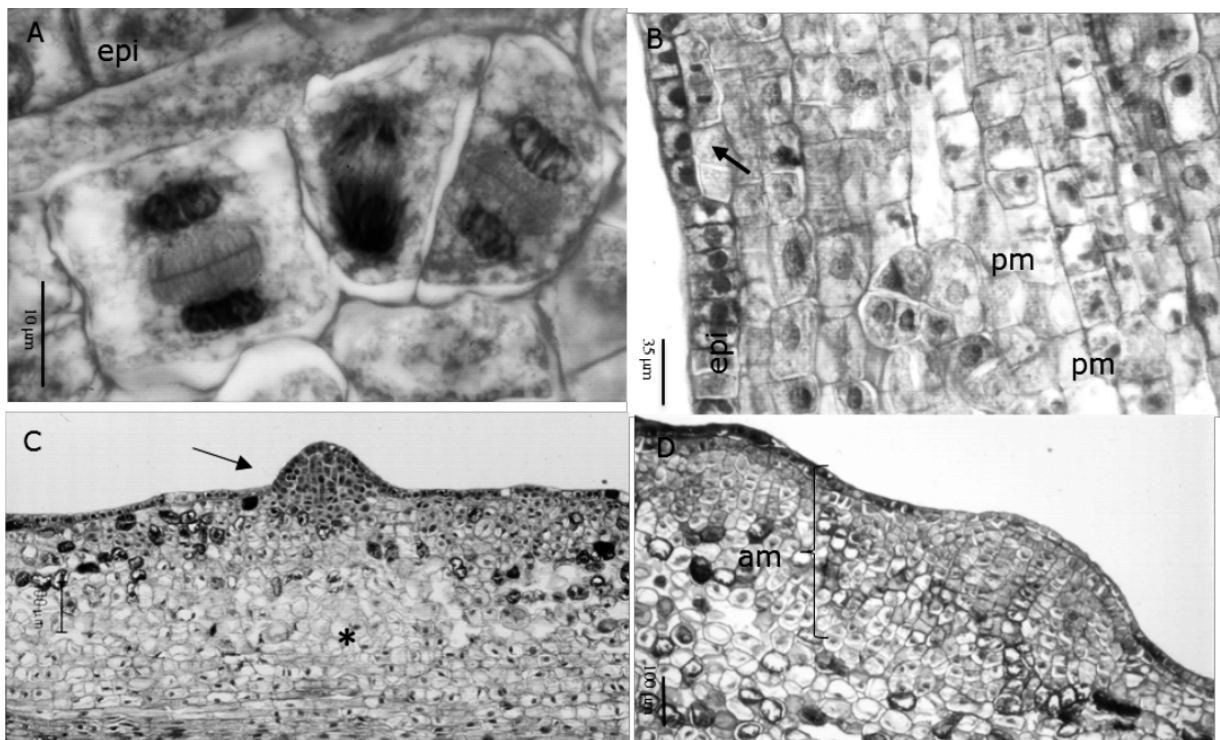


Cot = Cotiledones; hco = Hipocotilo; ma = Meristemo apical; mr = Meristemo radicular; epi = Epidermis; subepi = Subepidermis/tejido fundamental; pvasc = Haz provascular.

Figura 2. Corte longitudinal de embrión maduro de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco y acercamiento de las capas de células que lo conforman.

El tercer y hasta el cuarto día de cultivo se caracterizaron por la reactivación de la actividad mitótica a través del explante, con divisiones celulares anticlinales en el tejido fundamental y provascular del hipocotilo, que probablemente aportaron al alargamiento del embrión. Asimismo, se advirtió la aparición de vacuolas, así como una notoria disminución en la cantidad de material de reserva en el tejido fundamental.

Entre el cuarto y el sexto día de cultivo surgieron divisiones celulares localizadas, periclinales y anticlinales, en las capas subepidérmicas (Figura 3A) y epidérmicas (Figura 3B) del eje embrionario, principalmente en las regiones intercotiledonarias y en la región media-distal del hipocotilo. La respuesta en los cotiledones fue más lenta que en el hipocotilo y las divisiones celulares fueron dispersas.



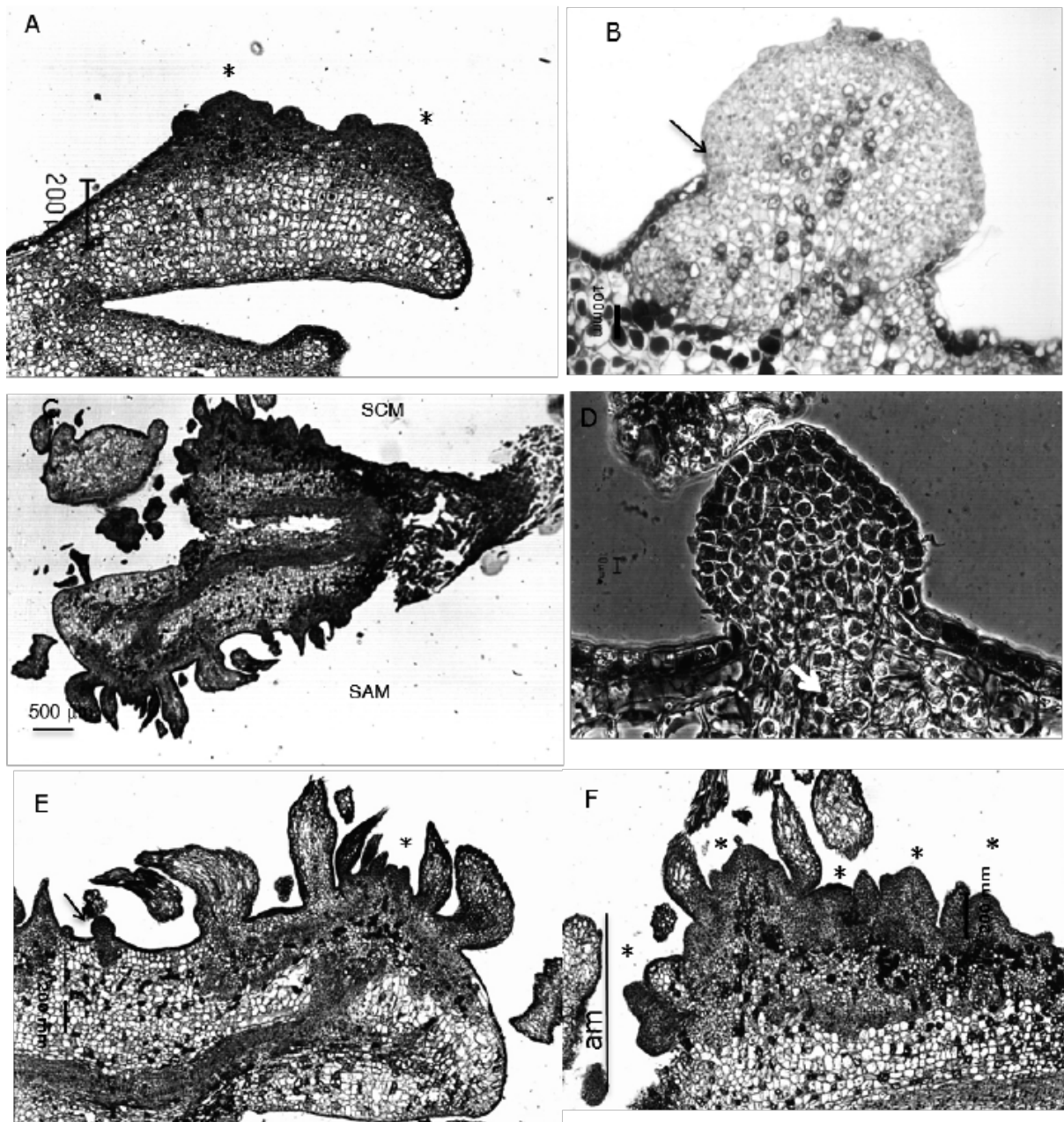
A. Formación de conjuntos de células en la capa subepidérmica a los seis días de cultivo (100X); B. Divisiones periclinales y anticlinales de la capa epidérmica (epi), así como promeristemoides (pm) en las capas subepidérmicas (20X); C. Meristemoide en el hipocotilo de la superficie en contacto con el medio a los después de 14 días de cultivo (10X); D. Región meristemática en el hipocotilo de la superficie alejada del medio después de 16 días de cultivo (10X).

Figura 3. Análisis estructural de las etapas tempranas de la formación de brotes adventicios a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos maduros de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.

A partir del sexto día, tanto en ANA/BA como en 2,4-D/K, el patrón morfogénético varió en función de la distancia del tejido con respecto al medio de cultivo. En la SAM se evidenciaron las primeras agrupaciones celulares y promeristemoides (estructuras de 4-6 células) (Figura 3B), que se iniciaron a partir de la activación mitótica de una o muy pocas células y revelaron una distribución dispersa en el tejido fundamental. Estas estructuras se formaron primero en la región media-distal del hipocotilo y posteriormente se extendieron a los cotiledones. A partir de los 12 días en ANA/BA y de los 14 días en 2,4-D/K, se detectaron los primeros meristemoides, con forma de domo, que dieron a la superficie del embrión una apariencia nodular (Figura 3C).

La epidermis formó parte de dichas estructuras al donar células mediante divisiones anticlinales. El cuerpo de los meristemoides creció por medio de divisiones periclinales y anticlinales de células del tejido fundamental. En los cotiledones, la actividad meristemática inició después de diez días de cultivo en ANA/BA, usualmente sobre la superficie abaxial y en el extremo de los mismos; mientras que en los tratamientos con 2,4-D/K, se presentó después de 16 a 22 días de cultivo y se limitó al ápice.

Por su parte, en la SCM se formaron áreas meristemáticas amplias (Figura 3D), que se caracterizaron por células pequeñas, de citoplasma denso y núcleo prominente, que se iniciaron a partir de divisiones anticlinales y periclinales de la epidermis, y de anticlinales, periclinales y oblicuas en las primeras dos capas subepidérmicas. En ANA/BA y 2,4-D/K, este patrón comenzó en la región media del hipocotilo a partir de los seis días, y después de los 10 a 12 días de cultivo en las regiones intercotiledonarias; mientras que los cotiledones respondieron tardíamente, a los 14 y 16 días en ANA/BA y 2,4-D/K, respectivamente. Después de 16 días alcanzaron un grosor de ocho a diez células y abarcaron la longitud total del embrión (sin la cofia), dándole una apariencia irregular, aun si las células se mantuvieron relativamente organizadas y contenidas por la epidermis (Figura 4A). A partir de los 22 y hasta los 45 días de cultivo, de éstas áreas se originaron estructuras nodulares de apariencia meristemática, de cuya superficie se diferenciaron yemas apicales; aunque en la mayoría de los casos la epidermis del embrión constituyó parte de la estructura, se observaron otras, posiblemente proembriones, que emergieron a la superficie después de romper la epidermis (Figura 4B).



A. Primordios de brotes formados sobre cotiledones después de 30 días de cultivo (4X); B. Estructura nodular meristemática formado en la superficie del hipocotilo de la SCM después de 30 días; la flecha señala la ruptura de la epidermis (10X); C. Formación de brotes a lo largo del hipocotilo y cotiledones después de 40 días (5X); D. Nódulo meristemático mostrando la diferenciación de traqueida (flecha), Normanski 50X; E. Acercamiento de un brote formándose sobre un cotiledón en la superficie alejada del medio (SAM), así como nódulo meristemático (flecha) (10X); F. Acercamiento de brotes formándose a partir de un área meristemática (am) de la superficie en contacto con el medio (SCM) (20X).

Figura 4. Etapas tardías del proceso de la formación de brotes adventicios a partir de embriones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco cultivados.

Los primeros brotes (conformados por un domo apical con primordios foliares) se distinguieron en el hipocotilo a partir de los 14 días de cultivo, aunque el proceso se generalizó entre los 20 y los 30 días en 2,4-D/K y ANA/BA, respectivamente; mientras que en los cotiledones se inició después de los 35 a los 40 días. Cortes longitudinales a los 45 días mostró que si bien muchos brotes estaban claramente diferenciados, el proceso de diferenciación fue asincrónico, particularmente en ANA/BA, ya que a esta fecha aún era posible identificar meristemoides o primordios en etapas tempranas de desarrollo, lo que prolongó el período de iniciación y el crecimiento de brotes y explica incremento notorio en número entre 90 y 130 días (Cuadro 2). En contraste, en los explantes sometidos a 2,4-D/K rara vez se evidenciaron meristemoides en etapas tardías del cultivo. Se reconoció el inicio de brotes a partir de los nódulos meristemáticos después de los 60 días en cultivo (Figura 4 C-F), para indicar su capacidad morfogenética. Se identificó la acumulación de taninos condensados alrededor de los meristemoides y yemas, así como la formación *de novo* de traqueidas asociadas, aún antes de que se evidenciaran los primordios foliares; sin embargo, rara vez se conectaron con el sistema vascular embrionario.

En el presente trabajo se advirtieron, también, los cambios celulares indicativos de la pérdida de la competencia, y por lo tanto, el comienzo de la recalcitrancia. Desde el día seis de cultivo, las células que no respondieron meristemáticamente formaron grandes vacuolas en su interior, y desplazaron al núcleo presionándolo contra la pared celular. En etapas tardías del cultivo, presentaron un arreglo laxo e irregular y la acumulación de polisacáridos en la matriz extracelular circundante, así mismo, muchas de ellas, sobre todo en la epidermis y cerca de los meristemoides y zonas meristemáticas, reunieron taninos en su interior.



Discusión

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos completos representa una alternativa viable de propagación de genotipos mexicanos de *P. menziesii* ya que aumenta el número de brotes, y potencialmente, el número de plantas que se pueden obtener de un solo embrión. Galindo *et al.* (2000) indican que la organogénesis a partir de embriones de dicha especie ocurre dentro de un intervalo de concentraciones de auxinas y citocininas relativamente amplio, tanto en ANA/BA como 2,4-D/K, aunque el número de brotes, la supervivencia y la velocidad de crecimiento de los mismos difiere.

La capacidad de responder morfogénicamente fue similar para ambos tratamientos, y se inició en los tejidos epidérmicos y subepidérmicos, tanto del hipocotilo como de los cotiledones. En general, esto contrasta con otros estudios en *Pseudotsuga*, en los que regularmente se utilizan cotiledones de embriones germinados *in vitro* como principal explante (Cheng y Voqui, 1977). Los resultados del presente trabajo demuestran que el manejo del embrión cigótico completo permite el aprovechamiento de diferentes regiones ontogénicamente predeterminadas para el crecimiento, que mantiene a las células en estado competente y puede representar una alternativa útil para la propagación *in vitro* en especies o genotipos recalcitrantes.

Se confirmó que el uso de BA promovió la formación de un mayor número de brotes, aunque en el tratamiento con K, adquirieron una apariencia más vigorosa. Datos similares se verificaron para otras especies con las cuales se comparó el efecto de diferentes tipos de citocininas sobre el crecimiento de brotes adventicios, incluyendo genotipos de *P. menziesii* de Estados Unidos de América (Cheng y Voqui, 1977), así como varias especies de *Pinus* (Pelletier y Laliberté, 2000; Montalbán *et al.*, 2011) y *Picea* (López *et al.*, 2000).

El menor número de brotes observado en 2,4-D/K después de 130 días de cultivo significa que el período durante el cual las células del explante se mantienen competentes es menor que en los cultivos de ANA/BA. Esto se corroboró con el análisis histológico, con el que se pudo evidenciar que en ANA/BA los explantes

producen meristemoides aún en etapas tardías de cultivo. Aunque no se conocen las causas de dicha respuesta, en otros sistemas se ha consignado que la capacidad de los explantes para absorber y metabolizar citocininas varía según el tipo de regulador, el tiempo de cultivo y el desarrollo del explante (Cortizo *et al.* 2009), lo cual se vea probablemente también afectado por el tipo de citocinina. No se puede descartar que el empleo de 2,4-D, considerado un inductor de callo y embriogénesis, pudo influir en una pérdida más rápida de la competencia, particularmente en los cotiledones.

La formación de brotes adventicios siguió el patrón descrito (Cheah y Cheng 1978; Yeung *et al.*, 1981; Villalobos *et al.*, 1985; von Arnold y Grönroos, 1986; López *et al.*, 2000) que inició con la reactivación mitótica de una o dos células que fomaron, en orden secuencial, promeristemoides, meristemoides y luego el domo apical integrado por el meristemo y los primordios foliares.

Sin embargo, la distribución espacial y la asincronía temporal del proceso morfogénico evidenció la importancia de la posición de las células con respecto al medio de cultivo para su competencia. Si bien se desarrollaron brotes tanto en la superficie alejada del medio, como en la que estaba en contacto directo con la misma, en los primeros, se iniciaron a partir de meristemoides individuales, mientras que en los segundos, en ANA/BA en particular, se formaron amplias zonas meristemáticas que diferenciaron brotes en etapas tardías del cultivo. Esto concuerda con la hipótesis de que el establecimiento de gradientes hormonales y nutrimentales en los explantes es un factor importante en la inducción de la competencia celular y la posterior determinación organogénica (Yeung *et al.*, 1981; Joy y Thorpe, 1999).

Según von Arnold y Grönroos (1986) las áreas meristemáticas son el resultado de la exposición supraóptima y prolongada a citocininas, por lo que la formación de meristemoides distintivos, se obtiene al reducir el tiempo de exposición a estos reguladores de crecimiento. En *Pinus banksiana* Lamb., se describe que las células en contacto con el medio proliferan, pero nunca dan origen a brotes (Pelletier y Laliberté, 2000), lo cual contrasta con las observaciones del presente trabajo.

Finalmente, se probó que la mayoría de los brotes formados tuvieron un origen multicelular, ya que los meristemoides se constituyeron por células donadas por la epidermis y por la subepidermis. Esto contrasta con registros previos del desarrollo de brotes a partir de explantes de cotiledón de *P. menziesii*, con un origen subepidérmico y que emergen al romper la epidermis (Cheah y Cheng, 1978), lo que sugiere una pérdida de la competencia de la epidermis en tejido diferenciado o con mayor grado de maduración.

En el estudio realizado, la epidermis experimentó una actividad mitótica importante, con divisiones anticlinales y periclinales, que donaron células tanto a la superficie del embrión como al tejido fundamental y las regiones meristemáticas en desarrollo. Tal comportamiento se ha observado en sistemas de micropropagación propuestos para *Pinus radiata* D. Don (Villalobos *et al.*, 1985), *Pinus strobus* L. (Flinn *et al.*, 1988) y *Abies amabilis* Douglas ex Forbes (Kulchetsky *et al.*, 1995). Aunque este tipo de reacción se estimuló con los tratamientos de inducción, es posible que también se haya facilitado por una predisposición de la epidermis a responder meristemáticamente, proceso que describió Allen (1947) en uno de los pocos trabajos publicados sobre la embriogénesis cigótica para el género. El origen multicelular de las estructuras puede tener un fuerte impacto sobre futuras estrategias de mejoramiento, particularmente si se consideran vías como la transformación genética, ya que la obtención de quimeras es altamente probable.

Conclusiones

Este trabajo hace un seguimiento del inicio y etapas tempranas de la formación de brotes adventicios a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros completos de *P. menziesii*, en respuesta a los tratamientos con ANA/BA y 2,4-D/K. El análisis histológico contribuye a la comprensión de los eventos celulares que preceden la generación de nuevos órganos, así como a la pérdida de competencia morfogenética e inicio de la recalcitrancia.

El número de brotes formados en ANA/BA es más alto que en 2,4-D/K, si bien el proceso fue más asincrónico. El análisis histológico muestra que el proceso de caulogénesis ocurre vía organogénesis directa y los brotes tienen un origen multicelular, ya que se conforman por células tanto de la epidermis como de las capas celulares subepidérmicas, lo que da lugar a zonas meristemáticas o meristemoides, según su distancia del medio de cultivo.

La pérdida de la competencia celular ocurre primero en 2,4-D/K, y el mayor número de brotes formados en ANA/BA resulta de una actividad meristemática prolongada.

Los estudios de esta índole constituyen la base de futuras investigaciones para la optimización de las técnicas de cultivo con importantes implicaciones al proveer un contexto estructural para abordar los eventos fisiológicos y moleculares que regulan la morfogénesis tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Agradecimientos

Florencia García recibió una beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) UNAM y Guadalupe Monjarás del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Este trabajo fue financiado por el Sistema de Investigación Ignacio Zaragoza (SIZA)-Conacyt (970603003) y por la Fundación Produce-Tlaxcala (UAT-06). Se agradece particularmente a los revisores anónimos por su lectura y comentarios al manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor

Florencia García Campusano: diseño y realización de los experimentos y elaboración del manuscrito; Guadalupe Monjarás González: realización de los experimentos; Gema Galindo Flores: diseño de experimentos, y elaboración y revisión del manuscrito; Alejandro Ponce Mendoza: análisis estadísticos de resultados; Víctor Manuel Chávez Ávila: revisión del manuscrito; Judith Márquez Guzmán: diseño de experimentos y revisión del manuscrito.

Referencias

- Allen, G. S. 1947. Embryogeny and the development of the apical meristems of *Pseudotsuga*. II. Late embryogeny. American Journal of Botany 34(2): 73-80. Doi: 10.1002/j.1537-2197.1947.tb12960.x.
- Bonga, J. M. 2015. A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. Canadian Journal of Forest Research 45(4): 379-383. Doi: 10.1139/cjfr-2014-0360.
- Carrillo B., M. G., J. L. Rodríguez De la O y J. G. Álvarez M. 2011. Morfogénesis *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 17(2): 273-282. Doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.04.024.
- Cheah, K. T. and T. Y. Cheng. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured Douglas-fir cotyledon. American Journal of Botany 65: 845-849. Doi: 10.2307/2442179.
- Cheng, T. Y. and T. H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. Science 198(4314): 306-307. Doi: 10.1126/science.198.4314.306.

- Cortizo, M., C. Cuesta, M. L. Centeno, A. Rodríguez, B. Fernández and R. Ordás. 2009. Benzyladenine metabolism and temporal competence of *Pinus pinea* cotyledons to form buds *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 166(10): 1069-1076. Doi: 10.1016/j.jplph.2008.12.013.
- Durzan, D. J. and P. K. Gupta. 1987. Somatic embryogenesis and polyembriogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Science* 52(3): 229-235. Doi: 10.1016/0168-9452(87)90056-2.
- Flinn, B. S., D. T. Webb and W. Newcomb. 1988. The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 66(8): 1556-1565. Doi: 10.1139/b88-214.
- Galindo F., G., F. García C., G. Monjarás G. y V. M. Chávez Á. 2000. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous a partir de embriones maduros. Investigación para el Desarrollo Regional. SEP-CONACYT. México, D. F., México. pp. 165-169.
- Gugger, P. F., A. González, H. Rodríguez, S. Sugita and J. Cavender B. 2011. Southward Pleistocene migration of Douglas-fir into Mexico: phylogeography, ecological niche modeling and conservation of 'rear edge' populations. *New Phytologist* 189:1185-1199. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03559.
- 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(4): 177-179. Doi: 10.1007/BF00269282.
- Hermann, R. K. and D. P. Lavender. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: *Pinaceae*. In: Russel, M. B. and B. H. Honkala (eds.) *Silvics of North America*. Vol 1: Conifers. Agriculture Handbook 654. Vol.1. USDA Forest Services. Washington D.C., USA. pp. 527-540.

- Joy, R. W. and T. A. Thorpe. 1999. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. *In*: Soh, W. and S. S. Bhojwani (eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures. Springer. The Netherlands. pp. 171-214.
- Juárez A., A., J. López U., J. J. Vargas H. and C. Sáenz R. 2006. Geographic variation in germination and initial seedling growth of *Pseudotsuga menziesii* of México. *Agrociencia* 40: 783-792.
- Kulchetsky, L., I. S. Harry, E. C. Yeung and T. A. Thorpe. 1995. *In vitro* regeneration of Pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. *Tree Physiology* 15(11): 727-738. Doi: 10.1093/treephys/15.11.727.
- López, A. L., L. P. Olgún, J. Márquez, V. M. Chávez and R. Bye. 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endangered Mexican spruce tree. *Annals of Botany* 86(2): 921-927. Doi: 10.1006/anbo.2000.1257
- Mápula, L., M., R. Bonilla y D. A. Rodríguez. 1996. Germinación y crecimiento inicial de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en Chapingo, México. *Revista Chapingo: Ciencias Forestales* 5: 111-117.
- Montalbán, I. A., N. De Diego and P. Moncaleán. 2011. Testing novel cytokinins for improved *in vitro* adventitious shoots formation and subsequent *ex vitro* performance in *Pinus radiata*. *Forestry* 84(4): 363-373. Doi: 10.1093/forestry/cpr022.
- Pelletier, G. and S. Laliberté. 2000. Effect of embryo orientation on the developmental sequence of adventitious organogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb). *Canadian Journal of Botany* 78(10): 1348-1360. Doi: 10.1139/b00-105
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.

Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50(1): 199-204. Doi: 10.1139/b72-026.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (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. 30 de diciembre de 2010. Diario Oficial de la Federación. México, D.F., México. 40 p.

Vargas, J. J., J. López U., V. J. Reyes, A. Domínguez and M. Mápula. 2004. Natural populations of Douglas- fir in Mexico: current status and needs for conservation. *In: Beaulieu J (ed.). Silviculture and the conservation of genetic resources for sustainable forest management. In: Proceedings of the symposium of the North American Forest Commission: forest genetic resources and silviculture working groups, and the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Quebec City, QC, Canada. pp. 26–36.*

Velasco G., M. V., J. López U., G. Ángeles P., J. J. Vargas H. and V. Guerra-de la C. 2007. *Pseudotsuga menziesii* seed dispersion in populations of central Mexico. *Agrociencia* 41:121-131.

Villalobos, V. M., E. C. Yeung and T. A. Thorpe. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 63(12): 2172-2176. Doi: 10.1139/b85-307

von Arnold, S. and R. Grönroos. 1986. Anatomical changes and peroxidase activity after cytokinin treatments inducing adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Botanical Gazette* 147(4): 425-431. Doi: 10.1086/337610

Winton, L. L. and S. A. Verhagen. 1977. Shoots from Douglas-fir cultures. *Canadian Journal of Botany* 55 (9): 1246-1250. Doi: 10.1139/b77-144

Yeung, E. C., J. Aitken, S. Biondi and T. A. Thorpe. 1981. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiate pine. *Botanical Gazette* 142:494-501.

Doi: 10.1086/337251.

Zavala C., F. y J. T. Méndez M. 1996. Factores que afectan la producción de semillas en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. en el Estado de Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana* 36: 1-13. Doi: 10.21829/abm36.1996.756.



Todos los textos publicados por la **Revista Mexicana de Ciencias Forestales** –sin excepción– se distribuyen amparados bajo la licencia *Creative Commons 4.0 [Atribución-No Comercial \(CC BY-NC 4.0 Internacional\)](#)*, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.