



DOI: 10.29298/rmcf.v15i84.1454

Artículo de investigación

Disminución de la oxidación e inducción de estructuras proembriogénicas en *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier
Reduction of oxidation and induction of proembryogenic structures in *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier

Víctor Rubén López Santos¹, Federico Antonio Gutiérrez Miceli¹, María del Carmen Silverio Gómez², Carlos Alberto Lecona Guzmán^{1*}

Fecha de recepción/Reception date: 8 de noviembre de 2023

Fecha de aceptación/Acceptance date: 17 de abril del 2024

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Tecnológico Nacional de México, Campus Tuxtla Gutiérrez. México.

²Campo Experimental Huimanguillo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.

*Autor para correspondencia; correo-e: leconaguzmancarlos@gmail.com.

*Corresponding author; e-mail: leconaguzmancarlos@gmail.com.

Resumen

Sideroxylon capiri (tempisque) es un árbol tropical de la familia Sapotaceae, considerado de suma importancia debido a su papel biológico, uso tradicional y alto contenido de metabolitos secundarios de interés. No obstante, debido a factores tanto naturales como antropogénicos, en México se ha catalogado como una especie amenazada de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010. Por lo anterior, es crucial el desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* para su conservación. En este contexto, se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP) y Picloram en la formación, proliferación y desarrollo de callo embriogénico y estructuras proembriogénicas, así como el efecto de la L-Cisteína en la reducción de la oxidación en callos, los cuales fueron expuestos a irradiación UV-B. Los resultados mostraron una respuesta positiva ante la aplicación de la combinación de BAP y Picloram en concentraciones de 4 y 2 mg L⁻¹, respectivamente sobre el crecimiento de los callos. Además, se observó la generación de callos proembriogénicos en concentraciones de 0.5 y 1 mg L⁻¹ de BAP y 1.5 y 2 mg L⁻¹ de Picloram. Adicionalmente, se logró estandarizar un medio de cultivo que disminuyó los procesos de oxidación y pardeamiento en los callos mediante el uso de L-Cisteína en concentraciones de 100 a 200 mg L⁻¹.

Palabra clave: Embriogénesis somática, fenoles totales, L-Cisteína, recalcitrancia, regeneración, tempisque.

Abstract

Sideroxylon capiri (*Tempisque*) is a tropical tree of the Sapotaceae family, considered of great importance from its biological role, traditional use and high content of secondary metabolites of interest. However, both natural and anthropogenic factors have led to its classification as a threatened species in Mexico according to the NOM-059-SEMARNAT-2010 regulation. Therefore, the development of an *in vitro* propagation protocol for the conservation of this species is crucial. Within this context, the effect of the growth regulators 6-Benzylaminopurine (BAP) and Picloram on the formation, proliferation and development of embryogenic callus and/or pro-embryogenic structures, as well as the effect of L-Cysteine on the reduction of oxidation in callus

which were exposed to UV-B irradiation, was evaluated. Results show a positive response to the application of the combination of BAP and Picloram at concentrations of 4 and 2 mg L⁻¹ respectively, on growth callus. Additionally, the generation of pro-embryogenic callus was observed at concentrations of 0.5 and 1 mg L⁻¹ of BAP and 1.5 and 2 mg L⁻¹ of Picloram. Furthermore, a culture medium was standardized that reduced callus oxidation and browning by using 100 to 200 mg L⁻¹ of L-Cysteine.

Key words: Somatic embryogenesis, total phenols, L-Cysteine, recalcitrance, regeneration, *Tempisque*.

Introducción

Sideroxylon capiri (A. DC.) Pittier, conocido por su nombre común como tempisque, es un árbol de interés maderable que pertenece a la familia Sapotaceae. Sus características morfológicas distintivas incluyen un fuste cilíndrico y hojas de forma alargada, de color verde; frutos de forma ovoide y contienen una semilla de testa dura (Newman, 2008). El tempisque se distribuye desde México hasta Panamá, a excepción de Belice; su presencia es fundamental a nivel ambiental y ecológico en los ecosistemas donde habita (García y Di Stefano, 2005).

El hábitat de *S. capiri* involucra interacciones complejas entre humanos y animales. Las hojas y frutos de esta especie se utilizan como fuente de alimento para una gran variedad de animales (Hiramatsu *et al.*, 2009; Almazán-Núñez *et al.*, 2021). Por otra parte, en las regiones donde crece, los pobladores usan sus frutos en la elaboración de condimentos; además, su madera se emplea ampliamente no solo como leña, sino también como material para la construcción de viviendas y cercos (Díaz *et al.*, 2011; Lazos-Monterrosa *et al.*, 2015). Otro uso que se destaca en algunas regiones de Centroamérica es el medicinal, ya que la corteza se aplica para el tratamiento de infecciones renales (Martínez-Silvestre *et al.*, 2022); lo que confirma su función multifacética en dichas sociedades.

En los últimos años, ha crecido el interés en el tempisque por su uso potencial como fuente de metabolitos secundarios. Robles-García *et al.* (2016) consignaron la presencia de fenoles y flavonoides en extractos metanólicos de sus hojas. Recientemente, Martínez-Silvestre *et al.* (2022) demostraron que la estimulación de los callos con luz UV-B y láser incrementa significativamente la concentración de fenoles y flavonoides, lo que distingue el potencial de esta especie como una fuente natural de esos compuestos para su aplicación en la biotecnología. Dichos compuestos son altamente valorados en diversas industrias como la farmacéutica, alimentaria y cosmética por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena (Mierziak *et al.*, 2014; Martínez-Silvestre *et al.*, 2022). Muchos de ellos, se producen en respuesta al estrés, aunque su presencia *in vivo* puede variar significativamente (Li *et al.*, 2020).

Sin embargo, promover su aprovechamiento requiere replantear el manejo de sus poblaciones naturales y plantaciones, ya que en las últimas décadas se ha observado una preocupante reducción de sus poblaciones en su hábitat natural, al grado que se le ha catalogado, en México, como una especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Semarnat, 2010). Esto se atribuye a diversas causas antropogénicas, entre las que sobresalen la tala desmedida, la invasión de su hábitat y el mal manejo de la especie; aunado a las presiones ambientales debidas al cambio climático (Cordero *et al.*, 2003; Antúnez, 2022). Por lo anterior, se ha intensificado la búsqueda de estrategias convencionales de propagación para promover la germinación de semillas, tales como la escarificación mecánica, química y la imbibición, las cuales no han logrado incrementar significativamente las tasas de germinación, las cuales se citan con valores por abajo de 30 % (Lazos-Monterrosa *et al.*, 2015).

La aplicación de técnicas biotecnológicas para propagar especies leñosas, como el cultivo de tejidos vegetales, presenta desafíos debido a la baja respuesta de los tejidos a las manipulaciones *in vitro* y la alta tasa de fenolización y oxidación de los

explantes (Mihai *et al.*, 2023). En el tempisque, el alto índice de oxidación de los explantes utilizados (hoja y semillas) en el proceso de inducción impiden la generación de reacciones que desencadenen la respuesta morfogénica *in vitro*, por lo que el establecimiento de un sistema de regeneración eficiente en el cual se obtengan plantas completas, no ha sido posible (Martínez-Silvestre *et al.*, 2022).

Hasta la fecha se carece de registros referentes a la regeneración *in vitro* de *S. capiri*; Martínez-Silvestre *et al.* (2022) describieron la obtención de callos no friables y compactos, sin lograr regenerar brotes o embriones somáticos debido al alto índice de fenolización y necrosis que presentaban los callos después de 30 días de cultivo. Además, los callos fueron estimulados mediante radiación UV-B con el objetivo de obtener metabolitos secundarios de interés en sistemas *in vitro*. Una opción para solucionar o disminuir el problema de la oxidación en los sistemas *in vitro* es el uso de antioxidantes como la L-Cisteína adicionada al medio de cultivo, la cual representa una alternativa para el control de los procesos oxidativos en los explantes, ya que actúa como agente reductor (Vásquez-Hernández *et al.*, 2021).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de 6-Bencilaminopurina y Picloram en la formación, proliferación y desarrollo de callo embriogénico o estructuras proembriogénicas, así como el efecto de la L-Cisteína en la reducción de la oxidación de los callos de tempisque, estimulados previamente con radiación UV-B.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron callos no irradiados e irradiados con luz UV-B provenientes de explantes de hojas de tempisque obtenidos por Martínez-Silvestre *et al.* (2022) en un estudio previo. Los callos irradiados habían sido expuestos a luz UV-B durante 0, 5, 10 y 15 min semana⁻¹, durante 2 semanas. Posteriormente, se mantuvieron en medio *Murashige* y *Skoog* (MS) sólido suplementado con 4 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP) (*Sigma Aldrich*[®], Alemania), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2.5 g L⁻¹ de *Phytigel* (*Sigma Aldrich*[®], Alemania) a un pH de 5.7 durante 2 meses, y se realizaron resiembras cada 15 días. Todo el material se conservó en un cuarto de cultivo a 25±2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz-8h oscuridad y a una intensidad lumínica de 35 μmol m² s⁻¹.

Efecto de L-Cisteína en la oxidación de callos irradiados con luz UV-B

Para evaluar el efecto de la L-Cisteína (*Sigma Aldrich*[®], Alemania) y la radiación UV-B sobre la oxidación en callos, se utilizó un diseño experimental multifactorial. El primer factor fue la concentración de L-Cisteína, con cinco niveles: 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹. El segundo factor fue el tiempo de exposición, con cuatro niveles: 0, 5, 10 y 15 min semana⁻¹. Cada unidad experimental contenía un callo y todos los tratamientos se llevaron a cabo con cuatro repeticiones. Los callos se cultivaron en tubos de ensaye (*Pyrex*[®], 9800-15) de 15×20 mm que contenían 10 mL de medio de cultivo MS descrito anteriormente,

suplementado con las concentraciones de L-Cisteína correspondientes. Los callos se mantuvieron durante 30 días en las condiciones previamente mencionadas.

El porcentaje de oxidación se calculó al dividir el callo en cuatro partes, y se consideró como el valor positivo, la presencia de oxidación en cada cuadrante. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA multifactorial y se compararon las medias mediante la prueba de *Tukey* ($p \leq 0.05$) con el *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*[®] (StatPoint Technologies Inc., 2010).

Obtención de extractos metanólicos

La obtención de extractos metanólicos se realizó con base en la metodología de Martínez-Silvestre *et al.* (2022) con algunas modificaciones. Para ello, 1 g de callo fresco proveniente de cada tratamiento de exposición a L-Cisteína, se maceró con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 10 mL de metanol 99 % v/v y se continuó con maceración durante 1 min para posteriormente dejar reposar durante 10 min. Los extractos se colocaron en tubos *Falcon*[®] de 15 mL y se dejaron reposar durante 24 h a una temperatura de 25 °C. Enseguida, se sometieron a ultrasonido (*CO-Z*[®], PS-30) por 20 min y centrifugaron (*Eppendorf*[®], 5430 R) a 3 500 rpm durante 10 min a 4 °C. De cada muestra se recuperó el sobrenadante y se le concentró en un evaporador rotativo (*BUCHI*[®], R-100) para después re-suspenderlo en 2 mL de metanol. El extracto final se colocó en tubos *Eppendorf*[®] y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Para evitar la fotooxidación todos los pasos se realizaron en oscuridad o cubriendo los materiales con papel aluminio, para limitar la exposición a la luz.

Cuantificación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo con base en la metodología descrita por Koufan *et al.* (2020) con algunas modificaciones. Se realizó una curva estándar de ácido gálico (*Fermont*[®], México), se hicieron diluciones de 0.1 mg mL⁻¹ a partir de una solución Madre (1 mg mL⁻¹). Para cada muestra se usaron 2.1 mL de agua destilada, 0.250 µL de reactivo de *Folin-Ciocalteu* (*Sigma Aldrich*[®], Alemania) y 50 µL de extracto, que se homogeneizaron en un vórtex (*IKA*[®], Vortex 2). Posteriormente, se adicionaron 0.5 mL de carbonato de sodio al 20 % (p/v), se homogeneizó nuevamente y se dejó reaccionar durante 2 h a 24 °C en completa oscuridad, para evitar la fotooxidación. Por último, se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (*Beckman Coulter*[®], DU 730) utilizando metanol como blanco. Los resultados se expresaron como equivalentes en mg de ácido gálico por gramo (mg EAG g⁻¹). Se llevaron a cabo tres repeticiones por muestra y los datos se analizaron mediante un ANOVA simple con el *software* estadístico *Statgraphics Centurion XIV*[®] (StatPoint Technologies Inc., 2010).

Inducción de callos embriogénicos

Se probaron dos tratamientos para la inducción de embriones somáticos, y se utilizaron como explantes callos previamente estimulados con 2 mg L⁻¹ de Picloram (*Sigma Aldrich*[®], Alemania). El primer tratamiento (IN1) consistió en medio MS suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 1.5 mg L⁻¹ de Picloram. El segundo

tratamiento (IN2) fue medio MS suplementado con 1 mg L⁻¹ de BAP y 2 mg L⁻¹ de Picloram. Para ambos tratamientos, se agregaron 25 mg L⁻¹ de L-Cisteína, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de *Phytigel* como agente gelificante. El periodo de evaluación fue de 30 días y se hizo una resiembra a los 15 días de iniciado el cultivo. Las variables de respuesta fueron el número de proembriones g⁻¹ de callo. Los proembriones se consideraron como estructuras friables, lisas, con bordes definidos y semicirculares, de color blancas-amarillas. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA simple y comparación de medias con la prueba de *Tukey* ($p \leq 0.05$) usando el software estadístico *Statgraphics Centurion XIV*[®] (StatPoint Technologies Inc., 2010).

Resultados

Efecto antioxidante de la L-Cisteína en callos irradiados con luz UV-B

La incorporación de L-Cisteína al medio de cultivo dio como resultado una reducción en la oxidación de los callos y promovió su desarrollo. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas entre las concentraciones de L-Cisteína suministrada al medio de cultivo a los 15 días ($p=0.0009$) y a los 30 días ($p=0.0001$). Además, un ANOVA multifactorial demostró que ambos factores y su interacción tuvieron efectos significativos sobre la oxidación, en particular el efecto

de las concentraciones de L-Cisteína ($p=0.0002$) y los tiempos de exposición a la luz UV-B ($p=0.0043$), en contraste con el efecto de la interacción entre factores ($p=0.076$). En el Cuadro 1, se exhibe que el mayor porcentaje de oxidación se verificó en los callos sin la adición de L-Cisteína al medio de cultivo y expuestos a un tiempo de 5 min semana⁻¹ de radiación. En contraste, los porcentajes más bajos de oxidación a los 15 días se observaron en los callos expuestos a 10 y 15 min semana⁻¹ de radiación, los cuales se desarrollaron en medio de cultivo MS suplementado con 100 y 200 mg L⁻¹ de L-Cisteína (Cuadro 1). Sin embargo, a los 30 días se obtuvo 100 % de reducción en la oxidación para todos los tiempos de exposición a la luz UV-B, con la adición de 200 mg L⁻¹ de L-Cisteína, por lo que fue el mejor tratamiento.

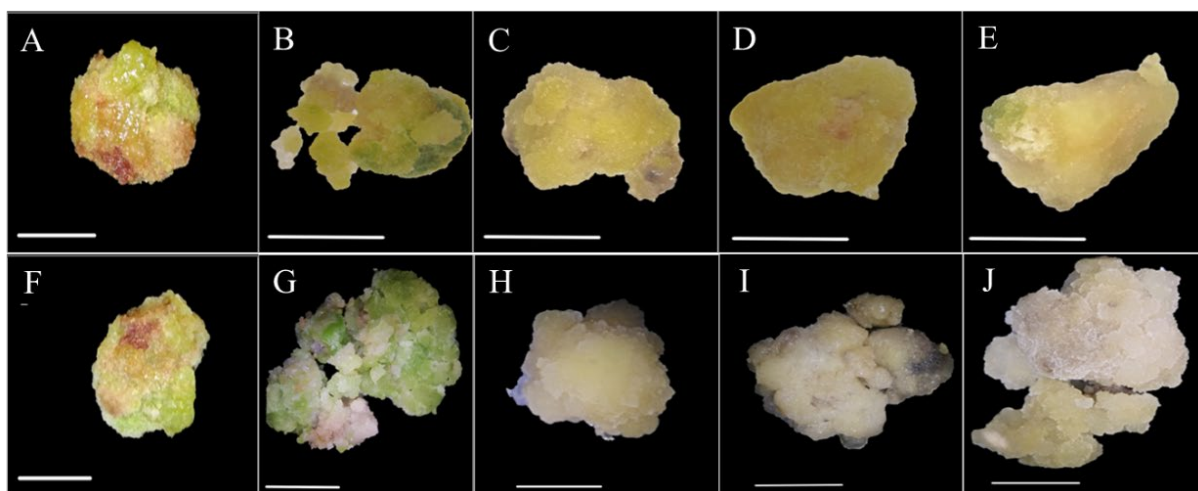
Cuadro 1. Efecto de L-Cisteína en la oxidación de callos de *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier a los 15 y 30 días de cultivo.

L-Cisteína (mg L ⁻¹)	Frecuencia de radiación (min semana ⁻¹)	% oxidación	
		15 días	30 días
0	0	50±20.41 ^{ab}	50±0.00 ^b
	5	75±14.43 ^b	100±0.00 ^c
	10	25±14.43 ^{ab}	50±20.41 ^b
	15	25±14.43 ^{ab}	25±0.00 ^{ab}
25	0	25±14.43 ^{ab}	25±14.43 ^{ab}
	5	50±20.41 ^{ab}	25±17.68 ^{ab}
	10	25±0.00 ^{ab}	25±0.00 ^{ab}
	15	25±0.00 ^{ab}	0±0.00 ^a
50	0	50±17.68 ^{ab}	50±17.68 ^b
	5	25±0.00 ^{ab}	25±0.00 ^{ab}
	10	25±0.00 ^{ab}	0±0.00 ^a
	15	25±10.21 ^{ab}	0±0.00 ^a
100	0	25±10.21 ^{ab}	25±10.21 ^{ab}
	5	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a
	10	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a

	15	25±0.00 ^{ab}	0±0.00 ^a
200	0	25±0.00 ^{ab}	0±0.00 ^a
	5	25±0.00 ^{ab}	0±0.00 ^a
	10	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a
	15	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a

Las letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de *Tukey* ($p \leq 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron por separado para cada tiempo de evaluación.

Se observaron variaciones en la coloración y en la consistencia de los callos a lo largo del proceso de cultivo, mismas que se relacionan con la concentración de L-Cisteína. Específicamente, se detectó que un aumento en la concentración de L-Cisteína resultaba en una ligera pérdida de pigmentación en los callos, además de provocar cambios en su textura, de una consistencia compacta a una friable (Figura 1).

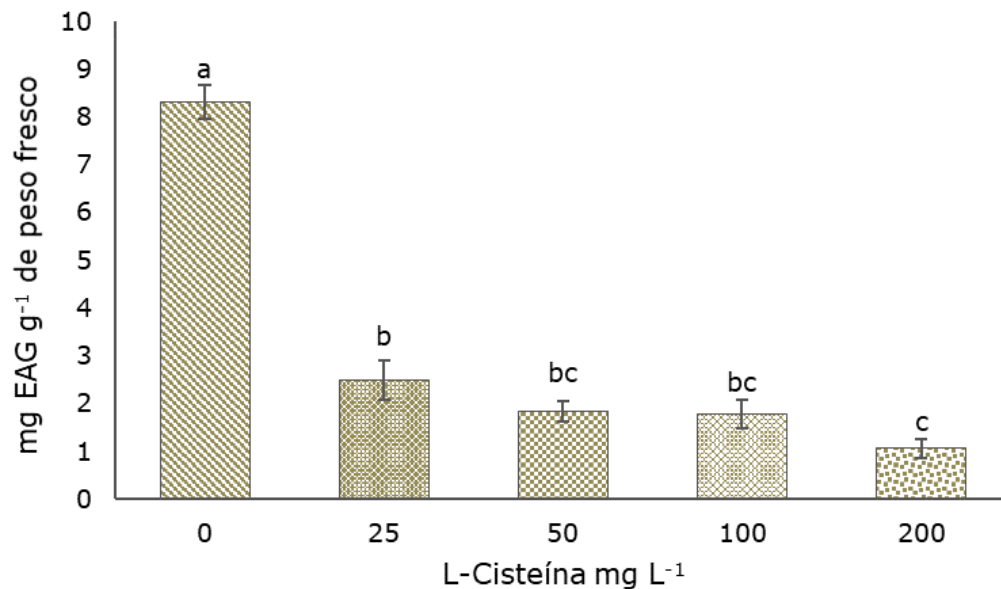


A-E = Callos a los 15 días del establecimiento del cultivo en medio MS; F-J = Callos a los 30 días del establecimiento del cultivo en medio MS; A y F = Callo control; B y G = 25 mg L⁻¹; C y H = 50 mg L⁻¹; D e I = 100 mg L⁻¹; E y J = 200 mg L⁻¹. La barra equivale a 1 cm.

Figura 1. Efecto de la L-Cisteína en callos de *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier.

Efecto de la L-Cisteína sobre la síntesis de fenoles

Respecto al contenido de fenoles totales en los callos de tempisque, se reconocieron diferencias significativas, en relación con el tratamiento control (Figura 2). El tratamiento con 200 mg L⁻¹ de L-Cisteína registró el menor contenido de fenoles totales (1.06 mg EAG g⁻¹), y el tratamiento control el mayor (8.312 mg EAG g⁻¹). El resto de los tratamientos no mostraron diferencia significativa entre sí, pero se presentó una disminución importante para todos los tratamientos y un comportamiento inversamente proporcional, en función a la cantidad de L-Cisteína a la que fueron sometidos los callos.

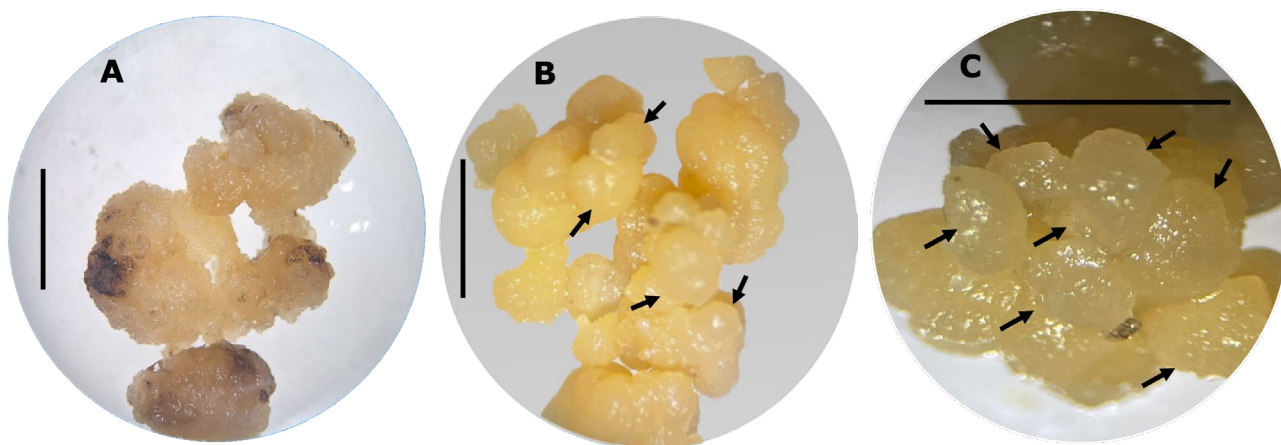


Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de *Tukey* ($p \leq 0.05$).

Figura 2. Efecto de la L-Cisteína en el contenido de fenoles en callos de *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier.

Efecto del Picloram en la formación de estructuras proembriogénicas

El desarrollo de los callos en medios tratados con 4 mg^{-1} de BAP y diferentes concentraciones de Picloram no resultó en la formación de órganos o embriones somáticos; en su lugar, se fomentó el crecimiento del callo y la formación de estructuras friables, de textura lisa, semicirculares y de color blanco-amarillo (Figura 3).



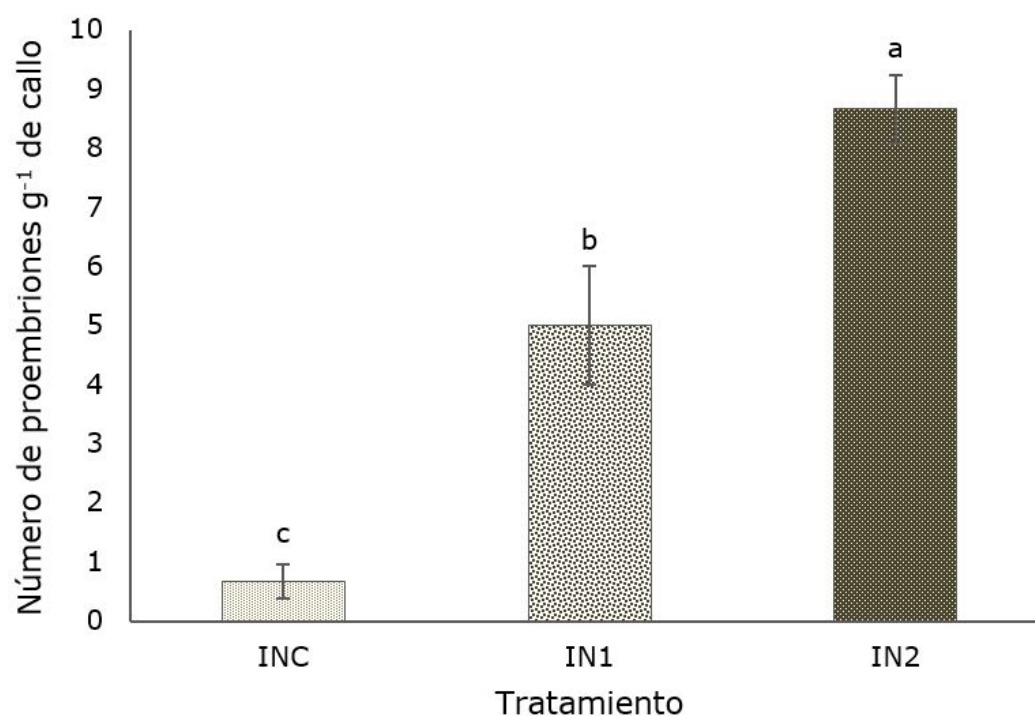
A = Callo control; B = Masas proembriogénicas provenientes del tratamiento IN1 sembrado en medio MS suplementado con 0.5 mg L^{-1} BAP + 1.5 mg L^{-1} Picloram;

C = Masas proembriogénicas provenientes del tratamiento IN2 en medio MS suplementado con 1 mg L^{-1} BAP+ 2 mg L^{-1} Picloram. La barra equivale a 2 cm.

Figura 3. Masas proembriogénicas formadas en callos de *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier a los 21 días de inducción.

En los tratamientos en donde se redujo la concentración de BAP y se aumentó la de Picloram se formaron pequeñas estructuras semicirculares en los callos, con bordes definidos y que se disgregaban, en comparación con los callos del tratamiento control (Figura 3C); sin embargo, estas estructuras no progresaron a estadios más avanzados de desarrollo, y tenían características de embriones globulares en una etapa primaria de la embriogénesis somática, con una coloración blanca-amarilla (masas proembriogénicas).

El tratamiento IN2 exhibió la mejor respuesta en cuanto al número de estructuras proembriogénicas formadas, con un promedio de 9 g^{-1} callo, seguido por el tratamiento IN1 que mostró una media de 5 g^{-1} callo; ambos tratamientos registraron una formación significativamente mayor de estructuras proembriogénicas en comparación con el tratamiento control, en el cual se contabilizó un promedio de 1 g^{-1} callo (Figura 4).



INC = Tratamiento control libre de reguladores; IN1 = Medio MS suplementado con 0.5 mg L⁻¹ BAP+1.5 mg L⁻¹ Picloram; IN2 = Medio MS suplementado con 1 mg L⁻¹ BAP+2 mg L⁻¹ Picloram. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de *Tukey* ($p \leq 0.05$).

Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de reguladores sobre la formación de proembriones de *Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier a los 21 días de inducción.

Discusión

Un reto fundamental para el cultivo *in vitro* de *S. capiri* es lograr el control de la oxidación de callos y la inducción *de novo* de embriones somáticos o brotes

adventicios. La oxidación de callos se observa como un oscurecimiento/pardeamiento del tejido. Es un fenómeno común en el cultivo *in vitro* de especies tropicales (Pancaningtyas, 2015) y se atribuye a la acumulación de compuestos fenólicos, los cuales al ser liberados al medio de cultivo inducen la activación de enzimas involucradas en su degradación, como las polifenol oxidasas y peroxidasas que generan quinonas, compuestos altamente reactivos que suelen ocasionar estrés celular (Azofeifa, 2009; Díaz *et al.*, 2020). Estos pueden interferir con el cultivo desde su establecimiento, su crecimiento y la capacidad de formación de estructuras proembriogénicas o embriones somáticos.

En este trabajo se observó que la L-Cisteína disminuye efectivamente la oxidación en cultivos de callos tratados con luz UV-B de *S. capiri* y la posterior inducción de proembriones. El efecto positivo del uso de L-Cisteína para el control de la síntesis de fenoles se ha registrado en cultivos de yemas de *Pimenta dioica* (L.) Merr. durante la fase de establecimiento *in vitro* con concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹ L-Cisteína (Vásquez-Hernández *et al.*, 2021); así como en cultivos de callos, a una concentración de 25 mg L⁻¹, en los que, además, generaban callos con una textura compacta y de coloración verde (Rajput *et al.*, 2023).

El decremento en el contenido de fenoles totales en los callos reafirma el efecto inhibitorio de la L-Cisteína en la síntesis de fenoles, que se atribuye al grupo tiol presente en la L-Cisteína, el cual atrapa los radicales libres y las quinonas (Cruz-Gutiérrez *et al.*, 2020) e inhibe la acción de la enzima polifenol oxidasa (Richard-Forget *et al.*, 1992). Asimismo, el aminoácido L-Cisteína actúa como un precursor del glutatión, un potente agente reductor que desempeña un papel crucial en los procesos de asimilación en las células vegetales de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Iqbal *et al.*, 2021; Koramutla *et al.*, 2021; Vásquez-Hernández *et al.*, 2021).

Este efecto inhibitorio de L-Cisteína en la producción de fenoles, además de reducir la oxidación de los callos de tempisque, ocasionó una decoloración de los mismos, conforme al aumento de la concentración utilizada y al tiempo de exposición (Figura 1).

La disminución en la coloración se atribuye a la alteración de diversos procesos enzimáticos ligados al metabolismo secundario, síntesis de fenoles y de pigmentos como una respuesta frente al estrés oxidativo (Azofeifa, 2009).

Es importante señalar que el cultivo de callos de tempisque es una opción para la producción de fenoles y otros compuestos con potencial farmacológico y biotecnológico (Martínez-Silvestre *et al.*, 2022); sin embargo, la aplicación de antioxidantes como L-Cisteína afecta directamente la acumulación de esos compuestos, a favor del desarrollo de callos y estructuras proembriogénicas, por lo que puede resultar contraproducente para este fin. Por lo anterior, la aplicación de agentes antioxidantes dependerá del objetivo que se persiga, ya sea la micropropagación o la producción de metabolitos secundarios *in vitro*.

Por otra parte, la combinación de reguladores de crecimiento puede afectar las características del cultivo, además de a la propia oxidación (Kamarul *et al.*, 2020; Cabañas-García *et al.*, 2021). Para el tempisque, el uso conjunto de auxinas y citocininas es necesario para la inducción y proliferación de callo (Martínez-Silvestre *et al.*, 2022); los resultados del presente trabajo muestran que también son necesarios para la inducción de estructuras proembriogénicas. En particular, combinaciones de BAP y Picloram se registran para el crecimiento de callo y para la producción de masas o estructuras con características de embriones globulares, en una fase temprana, de coloración blanca-amarilla en *Polyalthia bullata* King (Kamarul *et al.*, 2020) y en *Euterpe precatória* Mart. (Barbosa *et al.*, 2022).

El Picloram a concentraciones de 2-4 mg L⁻¹ en el medio de cultivo, estimula el crecimiento de masas callosas y la formación de embriones en especies leñosas (Chukwunalu *et al.*, 2018; Kamarul *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2022), aunque las concentraciones efectivas pueden variar en función del taxón (Manoharan *et al.*, 2016). Este regulador aumenta las concentraciones endógenas de auxinas, lo que permite la formación de las primeras etapas embrionarias, al promover

efectivamente la elongación y división celular (Rodríguez *et al.*, 2014); aunque posteriormente, es necesario disminuir la concentración de auxinas para que ocurra la transición de las diferentes fases de histodiferenciación (Liu *et al.*, 2021).

Además de las auxinas, las citocininas desempeñan una función positiva en la adquisición de capacidad embrionaria por parte de las células somáticas, por lo que se requiere de la presencia de ambos reguladores (Rodríguez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2021). Las citocininas participan activamente en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, a través de la vía de transducción de señales ayudan a la diferenciación celular, a la diferenciación de tejidos, a la formación de brotes laterales y a mitigar el estrés generado por factores abióticos (Li *et al.*, 2021). Durante la etapa de inducción de la embriogénesis somática, la incorporación de las citocininas, conjuntamente con las auxinas, es fundamental para algunas especies leñosas como *Picea abies* (L.) H. Karst., en las que se forman estas estructuras después de la eliminación de ambos reguladores (Larsson *et al.*, 2008). Sánchez *et al.* (2019) refieren que en el caso del café (*Coffea arabica* L.), la formación de masas proembriogénicas se relaciona con la reducción de la concentración de BAP en el medio de cultivo. En contraste, la supresión de la actividad de las citocininas, como consecuencia de la sobreexpresión de genes reguladores de respuesta de auxinas (ARR), disminuye la formación de embriones somáticos o induce un desarrollo anormal de los mismos, ya que carecen de meristemo radicular (Su *et al.*, 2015). Lo anterior, demuestra que las citocininas actúan como un factor importante para la formación de embriones somáticos inducida por auxinas.

La falta de respuesta organogénica o embriogénica durante el cultivo de especies leñosas puede ser resultado de la limitada receptividad del tejido vegetal, como consecuencia de las manipulaciones *in vitro* (Lazos-Monterrosa *et al.*, 2015). Sin embargo, no debe descartarse el efecto inhibitorio en el desarrollo ligado a la producción de compuestos fenólicos, a la concentración y tiempo de exposición a reguladores de crecimiento que podrían afectar la síntesis de proteínas involucradas

en la formación y al desarrollo de órganos y embriones (George *et al.*, 2008; Quiñones *et al.*, 2020). Por ello, la incorporación de compuestos como L-Cisteína representa una alternativa para controlar su acumulación excesiva.

Conclusiones

En este estudio se demuestra que para el cultivo *in vitro* de callos de *S. capiri*, la incorporación de L-Cisteína en concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹ al medio es eficiente para manejar la oxidación, ya que se reduce considerablemente la síntesis de fenoles totales. Por otro lado, la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de BAP con niveles entre 1.5 y 2 mg L⁻¹ de Picloram promueve la formación de estructuras proembriogénicas en callos de tempisque.

Estos hallazgos ofrecen información valiosa que puede emplearse en la formulación de futuros protocolos de regeneración, a través de vías embriogénicas u organogénicas; lo que potencialmente impulsará programas de conservación, que permitan un mejor aprovechamiento de la especie, que es una significativa fuente de metabolitos secundarios con relevancia en el ámbito biotecnológico.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Tecnológico Nacional de México Campus Tuxtla Gutiérrez por brindar sus instalaciones para la realización de esta investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribución por autor

Víctor Rubén López Santos, Federico Antonio Gutiérrez Miceli y María del Carmen Silverio Gómez: análisis estadístico e interpretación de resultados; Carlos Alberto Lecona Guzmán y Federico Antonio Gutiérrez Miceli: concepción y diseño del estudio; Carlos Alberto Lecona Guzmán y María del Carmen Silverio Gómez: redacción y corrección del manuscrito. Todos los autores revisaron los resultados y aprobaron la versión final del documento.

Referencias

- Almazán-Núñez, R. C., E. A. Alvarez-Alvarez, P. Sierra-Morales and R. Rodríguez-Godínez. 2021. Fruit size and structure of zoochorous trees: Identifying drivers for the foraging preferences of fruit-eating birds in a Mexican successional dry forest. *Animals* 11(12):3343. Doi: 10.3390/ani11123343.
- Antúnez, P. 2022. Main environmental variables influencing the abundance of plant species under risk category. *Journal of Forestry Research* 33:1209-1217. Doi: 10.1007/s11676-021-01425-6.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):153-175. Doi: 10.15517/am.v20i1.4990.
- Barbosa F., J. C., I. M. de A. Silva-Cardoso, R. de Oliveira M. and J. E. Scherwinski-Pereira. 2022. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos

of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 148:667-686. Doi: 10.1007/s11240-022-02227-2.

Cabañas-García, E., C. Areche, Y. A. Gómez-Aguirre, J. Borquez, ... and E. Pérez-Malphe Balch. 2021. Biomass production and secondary metabolite identification in callus cultures of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae), a traditional medicinal plant. South African Journal of Botany 137:1-9. Doi: 10.1016/j.sajb.2020.10.002.

Chukwunalu, O., M. Balogun, N. Maroya and R. Asiedu. 2018. Development of micropropagation system for yam (*Dioscorea* spp.) using somatic embryogenesis. International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan, OY, Nigeria. 8 p. Doi: 10.13140/RG.2.2.17246.38726.

Cordero, J., F. Mesén, M. Montero, J. Stewart, ... y G. Detlefsen. 2003. Descripciones de especies de árboles nativos de América Central. *In*: Cordero, J. y D. H. Boshier (Edits.). Árboles de Centroamérica, un Manual para el Extensionista. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, C, Costa Rica. pp. 311-959. https://books.google.com.mx/books?id=q-0NAQAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. (21 de agosto de 2023).

Cruz-Gutiérrez, E. J., L. M. Hernández-Fuentes and L. A. Gómez-Reyes. 2020. Uso de L-Cisteína para el control de oxidación *in vitro* de *Annona muricata* L. Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación 6(3):1-6. <https://www.remai.ipn.mx/index.php/REMAI/article/view/75>. (16 de mayo de 2023).

Díaz L., M. I., J. M. Rodas R., L. R. González S. y M. Vera de O. 2020. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. Biotecnología Vegetal 20(3):203-210. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/672>. (21 de agosto de 2023).

- Díaz M., M. G., Ó. Farrera S. y M. A. Isidro V. 2011. Estudio etnobotánico de los principales mercados de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Lacandonia* 5(2):21-42. <https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/1759>. (13 de octubre de 2023).
- García, E. G. y J. F. Di Stefano. 2005. Fenología del árbol *Sideroxylon capiri* (Sapotaceae) en el Bosque Seco Tropical de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 53(1-2):5-14. Doi: 10.15517/rbt.v53i1-2.14292.
- George, E. F., M. A. Hall and G.-J. De Klerk. 2008. Plant tissue culture procedure-Background. *In*: George, E. F., M. A. Hall and G.-J. De Klerk. (Edits.). *Plant propagation by tissue culture*. Springer. Dordrecht, ZH, The Netherlands. pp. 1-28. Doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3_1.
- Hiramatsu, C., A. D. Melin, F. Aureli, C. M. Schaffner, M. Vorobyev and S. Kawamura. 2009. Interplay of olfaction and vision in fruit foraging of spider monkeys. *Animal Behaviour* 77(6):1421-1426. Doi: 10.1016/j.anbehav.2009.02.012.
- Iqbal, N., S. Umar, N. A. Khan and F. J. Corpas. 2021. Nitric oxide and hydrogen sulfide coordinately reduce glucose sensitivity and decrease oxidative stress via ascorbate-glutathione cycle in heat-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Antioxidants* 10(1):108. Doi: 10.3390/antiox10010108.
- Kamarul Z., M. A., A. M. Azzeme, I. K. Ramle, N. Normanshah, ... and S. N. Akmar A. 2020. Induction, multiplication, and evaluation of antioxidant activity of *Polyalthia bullata* callus, a woody medicinal plant. *Plants* 9(12):1772. Doi: 10.3390/plants9121772.
- Koramutla, M. K., M. Negi and B. T. Ayele. 2021. Roles of glutathione in mediating abscisic acid signaling and its regulation of seed dormancy and drought tolerance. *Genes* 12(10):1620. Doi: 10.3390/genes12101620.
- Koufan, M., I. Belkoura, M. A. Mazri, A. Amarraque, ... and T. Alaoui. 2020. Determination of antioxidant activity, total phenolics and fatty acids in essential oils and other extracts from callus culture, seeds and leaves of *Argania spinosa*

(L.) Skeels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 141:217-227. Doi: 10.1007/s11240-020-01782-w.

Larsson, E., F. Sitbon, K. Ljung and S. von Arnold. 2008. Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist* 177(2):356-366. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02289.x.

Lazos-Monterrosa, F. A., C. Orantes-García, O. Farrera-Sarmiento, A. G. Verdugo-Valdez, M. S. Sánchez-Cortés y L. E. Ruiz-Meza. 2015. Evaluación de la viabilidad y germinación de tempisque [*Sideroxylon capiri* (A. DC.) Pittier Sapotaceae]. *Phyton Revista Internacional de Botánica Experimental* 84(1):138-143. Doi: 10.32604/phyton.2015.84.138.

Li, S. M., H. X. Zheng, X. S. Zhang and N. Sui. 2021. Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Reports* 40:271-282. Doi: 10.1007/s00299-020-02612-1.

Li, Y., D. Kong, Y. Fu, M. R. Sussman and H. Wu. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 148:80-89. Doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.

Liu, Y., C. Wei, H. Wang, X. Ma, H. Shen and L. Yang. 2021. Indirect somatic embryogenesis and regeneration of *Fraxinus mandshurica* plants via callus tissue. *Journal of Forestry Research* 32(4):1613-1625. Doi: 10.1007/s11676-020-01199-3.

Manoharan, R., J. N. Tripathi and L. Tripathi. 2016. Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126:481-497. Doi: 10.1007/s11240-016-1017-2.

Martínez-Silvestre, K. E., J. A. Santiz-Gómez, M. C. Luján-Hidalgo, N. Ruiz-Lau, Y. Sánchez-Roque and F. A. Gutiérrez-Miceli. 2022. Effect of UV-B radiation on flavonoids and phenols accumulation in Tempisque (*Sideroxylon capiri* Pittier) Callus. *Plants* 11(4):473. Doi: 10.3390/plants11040473.

- Mierziak, J., K. Kostyn and A. Kulma. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* 19(10):16240-16265. Doi: 10.3390/molecules191016240.
- Mihaj, R. A., E. J. Melo H., E. A. Pinto V., I. A. Espinoza C., ... and L. I. Florescu. 2023. Somatic embryogenesis of representative medicinal trees in South America—Current status. *Forests* 14(10):2066. Doi: 10.3390/f14102066.
- Newman, M. F. 2008. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 57. Sapotaceae Juss. Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, D. F., México. 20 p.
- Pancaningtyas, S. 2015. Study on the presence and influence of phenolic compounds in callogenesis and somatic embryo development of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan* 31(1):14-20. Doi: 10.22302/jicri.jur.pelitaperkebunan.v31i1.81.
- Quiñones A., M., N. Yafac, R. Garavito-Salini y L. Príncipe. 2020. Desdiferenciación celular *in vitro* de *Coffea arabica* L. "Café" var. *caturra* a partir de explantes foliares. *Scientia* 22(22):141-148. Doi: 10.31381/scientia.v22i22.3573.
- Rajput, D. S., T. S. Rathore, S. A. Ansari, M. Faisal, ... and A. Shahzad. 2023. Biochemical changes in embryogenic and non-embryogenic callus of *Bambusa nutans* Wall. during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 155(1):127-135. Doi: 10.1007/s11240-023-02559-7.
- Richard-Forget, F. C., P. M. Goupy and J. J. Nicolas. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(11):2108-2113. Doi: 10.1021/jf00023a014.
- Robles-García, M. A., J. Aguilar A., M. Gutiérrez-Lomelí, F. Rodríguez-Félix, ... y C. L. Del-Toro-Sánchez. 2016. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylom capiri* Pittier). *Biotecnia* 18(3):3-8. Doi: 10.18633/biotecnia.v18i3.328.
- Rodríguez B., M. M., M. I. Latsague V., M. A. Chacón F. y P. K. Astorga B. 2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de

cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. Bosque 35(1):111-118. Doi: 10.4067/S0717-92002014000100011.

Sánchez J., K., R. Cabrera P. y J. Jiménez D. 2019. Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. Scientia Agropecuaria 10(2):259-264. Doi: 10.17268/sci.agropecu.2019.02.11.

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. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010. México, D. F., Mexico. 78 p.

StatPoint Technologies Inc. 2010. Statgraphics Centurion XVI.II. Warrenton, VA, United States of America. StatPoint Technologies, Inc.

Su, Y. H., Y. B. Liu, B. Bai and X. S. Zhang. 2015. Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. Frontiers in Plant Science 5:792. Doi: 10.3389/fpls.2014.00792.

Vásquez-Hernández, S., C. A. Cruz-Cruz, M. Santiago-Santiago and J. J. Bello-Bello. 2021. Evaluation of different antioxidants during *in vitro* establishment of allspice (*Pimenta dioica* L. Merrill): a recalcitrant species. Agro Productividad 14(11):149-157. Doi: 10.32854/agrop.v14i11.2167.



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 \(CC BY-NC 4.0 Internacional\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.