



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Tesis:

Embriogénesis somática *in vitro* en palma de soyamiche

[*Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon]

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biotecnología Agrícola



Presenta:

Ma. Guadalupe Mayo Mayo

Bajo la supervisión de: Dr. José Luis Rodríguez de la O



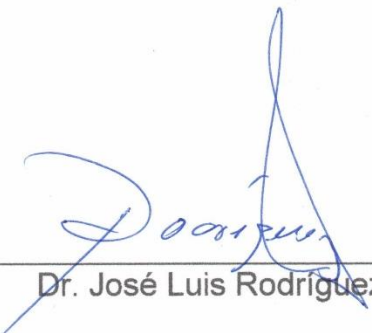
Chapingo, Estado de México, febrero 2024

**Embriogénesis somática *in vitro* en palma de soyamiche
[*Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon]**

Tesis realizada por **Ma. Guadalupe Mayo Mayo** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro(a) en Ciencias en Biotecnología Agrícola

Director: _____


Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesora: _____


Dra. María Sol Robledo y Monterrubio

Asesor: _____


Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

CONTENIDO

I.	RESUMEN GENERAL.....	1
II.	GENERAL ABSTRACT.....	2
III.	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
IV.	OBJETIVOS	5
	Objetivo general.....	5
	Objetivos específicos	5
V.	REVISIÓN DE LITERATURA	6
	Familia <i>Arecaceae</i>	6
	<i>Cryosophila nana</i> (palma de soyamiche).....	7
	Importancia y usos de la palma de soyamiche	8
	Problemas de propagación en palmeras.....	9
	Cultivo de <i>in vitro</i> (Embriogénesis somática)	10
	Embriogénesis somática en palmas.....	11
	Técnicas histológicas en la embriogénesis somática.....	12
	Microscopía de fluorescencia.....	13
	LITERATURA CITADA.....	14
VI.	OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS A PARTIR DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CALLOS DE PALMA DE SOYAMICHE (<i>CRYOSOPHILA NANA</i>).....	21
	RESUMEN	21
	ABSTRACT	22

MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
DISCUSIÓN	41
LITERATURA CITADA.....	46
VII. DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS OBTENIDOS IN VITRO DE PALMA DE SOYAMICHE (<i>CRYOSOPHILA NANA</i>)	52
RESUMEN	52
ABSTRAC	53
INTRODUCCIÓN	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
RESULTADOS.....	57
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIÓN	71
LITERATURA CITADA.....	71

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en cada una de las etapas de la embriogénesis somática en palma de soyamiche	28
Cuadro 2. Categorías de las variables cualitativas en cada una de las etapas o fases de la embriogénesis somática en palma de soyamiche.	28
Cuadro 3. Análisis de varianza de los pesos de los callos a los cero días de cultivo para los diferentes tratamientos.	31

Cuadro 4. Análisis de varianza de los pesos de los callos a los 42 días de cultivo para los diferentes tratamientos.	32
Cuadro 5. Análisis de varianza de los pesos de los callos a los 84 días de cultivo para los diferentes tratamientos.	32
Cuadro 6. Análisis de comparación de medias Tukey de los pesos de los callos para los distintos tratamientos.	32
Cuadro 7. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de inducción de callo de la embriogénesis somática en palma de soyamiche a los 70 días de cultivo.	33
Cuadro 8. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de formación de embriones de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 14 días después del cultivo.	34
Cuadro 9. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de formación de embriones de la embriogénesis somática en palma de soyamiche después 42 días del cultivo.	35
Cuadro 10. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de formación de embriones de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 56 días después del cultivo.	35
Cuadro 11. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 14 días después del cultivo.	37
Cuadro 12. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 28 días después del cultivo.	37

Cuadro 13. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 42 días después del cultivo.	37
Cuadro 14. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 63 días después del cultivo.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palma de soyamiche (<i>Cryosophila nana</i>).	7
Figura 2. Estructura de la semilla y el embrión de la palma de soyamiche.	8
Figura 3. Tipos de callos obtenidos en medio MS con TDZ después de 70 días de cultivo.	30
Figura 4. Análisis descriptivo de los niveles de diferenciación de los embriones somáticos de palma de soyamiche cultivados en medio para maduración.	38
Figura 5. Proceso de embriogénesis somática en palma de soyamiche.	40
Figura 6. Callo embriogénico de la palma de soyamiche obtenido a partir de embriones cigóticos.	59
Figura 7. Estructura embriogénica observada en medio de cultivo para inducción de callo después de 70 días de cultivo.	59
Figura 8. Proembriones o estructuras globulares de la palma de soyamiche obtenidas en medio para formar embriones.	60
Figura 9. Proembriones o estructuras globulares de la palma de soyamiche con suspensor.	62

Figura 10. Embrión somático tipo torpedo de palma de soyamiche.	63
Figura 11. Embrión somático en estado torpedo con evidencia de embriogénesis secundaria.....	65
Figura 12. Embrión somático mutante con dos primordios foliares.	67

Dedicatorias

A Dios, porque con la ciencia se le puede llegar a conocer, pero nunca a comprender.

A mis padres que con su apoyo incondicional me demuestran una vez más lo mucho que me aman.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca brindada durante la maestría.

Al doctor José Luis Rodríguez de la O por aceptar dirigir este trabajo y por su paciencia y enseñanzas.

A la doctora María Sol Robledo y Monterrubio por la asesoría durante la parte histológica del proyecto.

Al doctor José Oscar Mascorro Gallardo por sus observaciones y correcciones en este trabajo.

A la señora Gisella, técnico de laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, por su asesoría técnica durante el proceso de la presente investigación.

Al Ingeniero Iván Venegas por su asesoría técnica durante los procedimientos histológicos.

A Blanca Narciso por su apoyo en la colecta del material vegetal utilizado.

Datos Biográficos



Datos personales

Nombre:	Ma. Guadalupe Mayo Mayo
Fecha de nacimiento:	14 de agosto de 1997
Lugar de nacimiento:	Ayutla de los Libres, Guerrero.
CURP:	MAMG970814MGRYYD01
Profesión:	Licenciada en Biotecnología
Cédula profesional:	12505892

Desarrollo académico

Bachillerato:	Colegio de Bachilleres del Estado de Guerrero
Licenciatura:	Universidad Autónoma de Guerrero
Maestría:	Universidad Autónoma Chapingo

I. RESUMEN GENERAL

Embriogénesis somática *in vitro* en palma de soyamiche [*Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon]

Cryosophila nana (Kunth) Blume ex Salomon, es una palma endémica de México, con importancia cultural, económica y medicinal. Sin embargo, debido a la sobreexplotación y destrucción de su hábitat, se encuentra en riesgo. Además, muchas especies de palmas presentan problemas de propagación convencional. Por lo que, se exploró la obtención y multiplicación de plantas a través de la embriogénesis somática *in vitro* lo anterior, permitiría su rescate, conservación y propagación. Para la palma de soyamiche, se estableció un protocolo de propagación *in vitro*, considerando, además, que para esta especie no existen antecedentes reportados. Se utilizaron como explantes embriones cigóticos inmaduros. El TDZ con 5.0 mg L⁻¹, resultó ser efectivo en la promoción de callos embriogénicos. Para la formación de embriones se requiere de una combinación baja de auxinas y citocininas, por otra parte, la maduración de embriones somáticos y posterior conversión a plántulas se presentó con 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. También, se realizó el análisis histológico para la descripción anatómica de los embriones somáticos, así como las características físicas de los callos embriogénicos, observando tres zonas diferentes compuestas por distintos tipos de células. Mientras que, las estructuras de tipo globular se presentaron con o sin suspensores. Se diferenciaron, embriones somáticos en su fase torpedo, con características bipolares y embriones con primordios foliares, con la combinación de los reguladores del crecimiento empleados. Finalmente, se establecieron las condiciones *in vitro* para la obtención y propagación de plantas vía embriogénesis somática indirecta, además de que se corroboró dicho proceso analizando la histología anatómica de los embriones somáticos obtenidos.

Palabras claves: reguladores de crecimiento, callo embriogénico, embriones somáticos, diferenciación, anatomía.

II. GENERAL ABSTRACT

***In vitro* somatic embryogenesis in soyamiche palm [*Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon]**

Cryosophila nana (Kunth) Blume ex Salomon (soyamiche palm) is a palm species endemic to Mexico, with cultural, economic and medicinal importance. However, due to overexploitation and habitat destruction, it is in danger of extinction. In addition, many palms species have conventional propagation problems. For these reasons, somatic embryogenesis is used in the rescue, conservation and propagation of different palm species. In soyamiche palm it was necessary to establish a protocol, because it is a species that has not been studied. In addition, zygotic embryos were used as explants, because of their advantages over other explant types. TDZ at 5 mg L⁻¹ turned out to be effective in the induction of embryogenic callus. For the formation of embryos, a low dose of auxins and cytokinins is required, while for maturation and subsequent conversion to seedlings, 1 mg L⁻¹ of 2,4-D was required; however, the seedlings obtained did not present roots. Also, the anatomical description of the somatic embryos was carried out, the embryogenic callus presented three different zones composed of different types of cells, globular embryos of unicellular and multicellular origin were presented, the above was determined by the presence of a suspensor. On the other hand, in the torpedo-type embryos, bipolarity was established and embryos were obtained with two leaf primordia, considered abnormal, this was a consequence of exposure to growth regulators. In vitro culture conditions were established for propagation via indirect somatic embryogenesis, and this process was corroborated by analyzing the anatomy of the somatic embryos obtained.

Keywords: growth regulators, embryogenic callus, somatic embryos, differentiation, anatomy.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad de plantas vasculares con aproximadamente 23, 314 especies, distribuidas en 2,854 géneros y 297 familias, una de ellas es *Arecaceae* (Villaseñor, 2016). La familia *Arecaceae* son plantas monocotiledóneas que habitan principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, sus miembros se caracterizan por tener una gran variación morfológica (Eiserhardt et al., 2011) y comprende aproximadamente 2600 especies, muchas de estas especies tienen una importancia económica relevante como alimento, bebida, fibra, aceite y ornamental (Segura et al., 2014).

Algunos de estos recursos fitogenéticos, como *Elaeis guineensis* o palma aceitera, resultan estratégicos para algunos países de Asia (Mayes, 2020) porque se extrae aceite comestible. En el caso de México, en particular entidades como Guerrero, *Cocus nucifera* o cocotero es un recurso importante (Senado de la República, 2019). Sin duda, la exploración o estudio de los taxa mexicanos que integran a *Arecaceae* es una tarea estratégica, sobre todo porque en México existen 62 especies de la familia *Arecaceae* registradas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 bajo categoría de riesgo (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2019).

Arecaceae se compone de cinco subfamilias y aproximadamente 38 especies endémicas mexicanas pertenecen a tres de ellas: *Arecoideae*, *Coryphoideae* y *Ceroxyloideae* (Segura et al., 2014). El género *Cryosophila* de la subfamilia *Coryphoideae*, tiene espinas numerosas y largas generalmente derivadas de raíces, que se distribuyen a lo largo del estípite, algunas veces formando un cono basal; su distribución es muy limitada y varias son endémicas locales, principalmente se encuentra en América Central, aunque se extiende desde América del Sur y hasta el norte de México (Evans, 1995).

Cryosophila nana (Kunth) Blume ex Salomón (soyamiche) es una especie que pertenece a la subfamilia *Coryphoideae*, que es endémica de México y se encuentra amenazada debido a la destrucción de su hábitat y sobreexplotación, además en la

actualidad no existen programas para su conservación (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006).

La palma de soyamiche tiene importancia económica, porque con sus hojas se elaboran artesanías, además las usan como material de construcción en comunidades rurales (Alatorre-Cobo et al., 2009). También, otras partes de las plantas como la flor y el cogollo se consumen y se utilizan con fines medicinales y de ornato (Luna-José & Rendón-Aguilar, 2008).

Lo anterior demuestra el potencial de la palma de soyamiche para su aprovechamiento, sin embargo, se sabe que varias especies de palma presentan problemas en la propagación convencional como: tiempos de germinación largos, porcentaje bajo de germinación, semillas recalcitrantes, ninguna o poca producción de hijuelos (Ley-López & Ávalos, 2017; Vegas et al., 2019). Por eso es que se han buscado técnicas alternativas a la propagación convencional que sean efectivas en la obtención y multiplicación de palmas, en este caso, se han utilizado herramientas de cultivo de tejidos como la embriogénesis somática (Meira et al., 2019).

En palmas la embriogénesis somática es la técnica más utilizada, estudiada y eficiente con fines de propagación (Silva-Cardoso et al., 2022). Sin embargo, la embriogénesis somática en palmas ha demostrado que los diferentes factores como: tipo de explante, madurez del mismo, tipo y concentraciones de reguladores de crecimiento, medio de cultivo y coadyuvantes son específicos para cada especie (Viñas & Jiménez, 2011; Solangi et al., 2020). Por lo que es necesario establecer las condiciones que permitan la embriogénesis somática en la palma de soyamiche.

Además, es necesario el uso de pruebas que permitan el estudio de los eventos que ocurren durante las diferentes etapas de la embriogénesis somática de plantas cultivadas *in vitro*, debido a que permiten dilucidar los procesos a nivel tisular y celular, así como, la identificación de los tejidos y células con potencial embriogénico (Meira et al., 2019).

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer las condiciones que permitan promover la obtención de plantas a partir de la embriogénesis somática *in vitro* de la palma de soyamiche.

Objetivos específicos

Evaluar diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para inducir callos embriogénicos y la posterior diferenciación a embriones somáticos *in vitro* en palma de soyamiche.

Describir cambios histológicos durante las fases embrionarias aunadas al proceso de la embriogénesis somática en la palma de soyamiche.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

Familia *Arecaceae*

La familia *Arecaceae* son plantas monocotiledóneas con flores que habitan principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, con una gran variación morfológica en los miembros de sus subfamilias (Eiserhardt et al., 2011), es una de las familias más diversas con aproximadamente 181 géneros y más de 2600 especies, las cuales se clasifican en cinco subfamilias y 28 tribus (Yao et al., 2023).

Muchas de las especies de palmas tienen una importancia económica relevante como alimento, bebida, fibra, aceite y ornamental (Segura et al., 2014). Algunos de estos recursos fitogenéticos, como *Elaeis guineensis* o palma aceitera, resultan estratégicos para algunos países de Asia porque se extrae aceite comestible (Mayes, 2020). Otra de las especies que es importante es la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), porque es el cultivo frutal más importante en medio oriente, el norte de África y la península arábiga (Hemmati et al., 2020). En el caso de México, en particular entidades como Guerrero, *Cocus nucifera* o cocotero es un recurso importante (Senado de la República, 2019).

Además, las palmas tienen importancia biológica y ecológica porque son alimento y refugio de animales y pueden formar comunidades llamadas “palmares”, las cuales son reconocidas como un tipo de vegetación en México (Pulido-Silva et al., 2023).

Sin duda, la exploración o estudio de los taxa mexicanos que integran a *Arecaceae* es una tarea estratégica, sobre todo porque en México existen 62 especies de la familia *Arecaceae* registradas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 bajo categoría de riesgo (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2019) y cuya problemática no se está atendiendo, porque existen especies como *Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon la cual se encuentra amenazada y no existen programas de protección.



Figura 1. Palma de soyamiche (*Cryosophila nana*). A) Palma de soyamiche a los 6 meses de edad. B) Palma de soyamiche a los 5 años de edad. C) Palma de soyamiche a los 6 años de edad con semillas inmaduras.

***Cryosophila nana* (palma de soyamiche)**

En México se encuentran tres subfamilias, 10 tribus, 21 géneros y 99 especies de palmas (37.7% de las cuales son endémicas), en la que el 62,7% de las especies se consideran raras (Pulido-Silva et al., 2023).

Una de estas especies considerada raras y que además es endémica de México es *Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomón o palma de soyamiche (Figura 1), es una palma solitaria, de entre 1.3-5 m de altura, además su tronco o estípite está cubierto de raíces que terminan en espinas cortas y gruesas que forman una masa densa enredada (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006). Sus hojas tienen la base del pecíolo sin dividir, con solo un orden de división de las hojas distales que pueden ser, anchas y largas triangulares, puntiagudas con pubescencia abaxial escasa; fruto de 1.3-1.9 cm de largo, 1.2-1.7 cm de diámetro, de forma esferoidal, a veces de ovoide a esférico-elipsoidal; semilla de 0.8-1.2 cm de diámetro, con forma esferoidal (Evans, 1995).

También, la palma de soyamiche es una especie monoica que se autofecunda y cuya germinación de las semillas tarda aproximadamente seis meses (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006). Además, se ha reportado que *C. nana* es una especie de palma que se puede propagar de forma vegetativa, ya sea regenerándose a partir de tocones o mediante enraizamiento de

esquejes en los cuales, las espinas del tallo invierten su dirección para arraigarse en el suelo (Moore, 2006).

Sin embargo, aún no existen estudios sobre su capacidad de enraizamiento o sobre técnicas *in vitro* que mejoren su propagación y es debido a sus diversos usos y potencial económico que es necesario el rescate de esta especie amenazada.

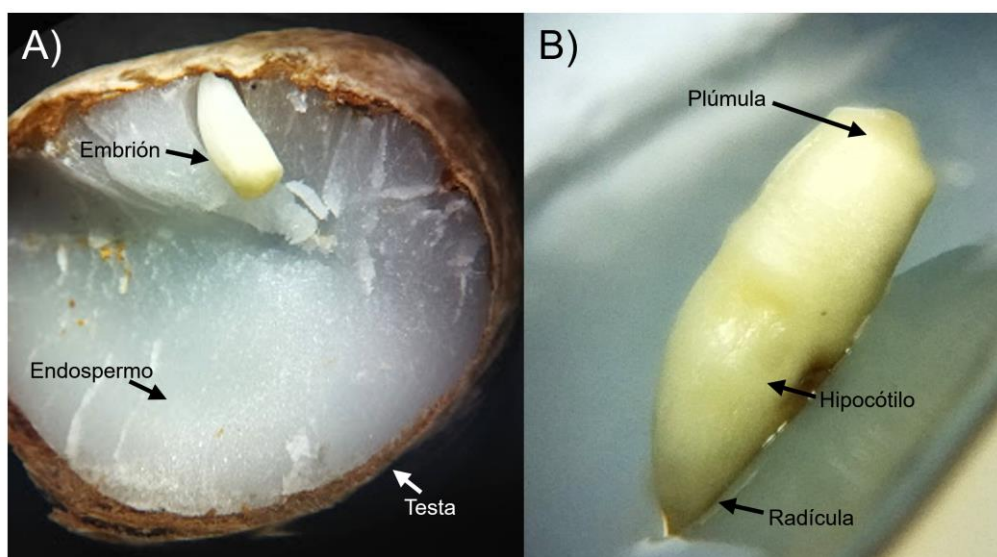


Figura 2. Estructura de la semilla y el embrión de la palma de soyamiche. A) Estructura de la semilla madura de la palma se soyamiche, el embrión se observa en la parte lateral de la semilla. B) Estructura del embrión inmaduro de la palma se soyamiche. **Fuente: propia.**

Importancia y usos de la palma de soyamiche

La palma de soyamiche se encuentra principalmente en los estados de Sinaloa, Colima, Chiapas, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Guerrero (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006). Tiene importancia económica, porque en algunas comunidades rurales aprovechan las hojas para elaborar escobas y techar casas, de igual forma con esta parte de la planta se hacen artesanías (Alatorre-Cobo et al., 2009). En comunidades de la sierra de Oaxaca se aprovecha la flor y el cogollo para consumo humano y también con fines medicinales y de ornato (Luna-José & Rendón-Aguilar, 2008).

En la región costera de Oaxaca, los botones florales de la palma se preparan hervidos, asados o cocidos al vapor. Además, se le considera un alimento nutritivo y que tiene propiedades hipoglucemiantes (Olivera-Triste, 2020). Se ha reportado que las inflorescencias de palma de somayiche contienen proteína en cantidad alta y compuestos bioactivos como: catequinas, avenantramidas y polifenoles, por lo que también podría tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas y antifúngicas (Olivera-Triste, 2020). También, los frutos son otras partes de la planta que se pueden aprovechar en fresco o fermentados para hacer vino (Haynes & McLaughlin, 2000).

Problemas de propagación en palmas.

Los principales problemas con las especies de palmas son: poseen semillas recalcitrantes, la germinación de las mismas en condiciones naturales es lenta y en porcentaje bajo (Vegas et al., 2019). Por ejemplo, se ha determinado que en aproximadamente 457 especies de palmas la germinación comienza a los 120 días, aunado a esto, alrededor del 25 % de las especies de palmeras muestran porcentajes de germinación inferiores al 20 % (Ley-López & Ávalos, 2017).

En el caso de la palma de soyamiche, Cruz-Jiménez (2015) evaluó la germinación en semillas de tres distintas procedencias, obtuvo porcentajes de germinación estándar de entre 49-73 % y 43.5-63.5 % para germinación en semilleros. Sin embargo, la palma de soyamiche es de las pocas palmeras que tiene propagación asexual pero no hay estudios sobre esto (Moore, 2006). Además, algunos de los miembros de la familia *Arecaceae* no se propagan de forma vegetativa y producen pocos hijuelos, como la palma datilera que solo producen aproximadamente 20 durante toda su vida. Sin embargo, especies como el cocotero y la palma aceitera no tienen propagación vegetativa debido a que carecen de brotes axilares (Ley-López & Ávalos, 2017).

Es debido a lo mencionado anteriormente que se buscan estrategias para la propagación *in vitro* en especies de palmeras como la embriogénesis somática, dicha técnica, se ha probado con el objetivo de propagar especies como: palma iraca (Zambrano-Arteaga et al., 2022), palma datilera (Solangi et al., 2020), cocotero

(Aguilera-Arango et al., 2019), *Butia adorata* (Fior et al., 2018), palma africana (Vegas et al., 2016), *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022), *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022) y *Acrocomia aculeata* (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014).

Cultivo de *in vitro* (Embriogénesis somática)

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales o solo cultivo *in vitro*, se caracteriza por la obtención de plantas (ya sea completas o partes de las mismas), de forma aséptica, en medios de cultivos artificiales y en un ambiente Testigoado (Suárez-Padrón, 2020).

La embriogénesis somática es una técnica de cultivo *in vitro* que permite obtener una gran cantidad de plantas a partir de porciones pequeñas de tejido vegetal y en períodos cortos de tiempo (Suárez-Padrón, 2020). Cuenta con una gran cantidad de aplicaciones como: producción de plantas de difícil propagación, clonación de plantas con características agronómicas especiales, obtención de plantas transgénicas, producción de semillas artificiales, conservación de germoplasma, producción de plantas libres de patógenos, conservación de especies en peligro de extinción, entre otras (Toledo-Espinosa, 2014).

La embriogénesis somática es inducida al estresar a los tejidos de plantas, algunas técnicas para provocar el estrés son: causar heridas, choque osmótico o térmico, pH extremo y tratamientos con diferentes sustancias químicas, sin embargo, el más común es a través de concentraciones altas de reguladores de crecimiento y algunos componentes del medio de cultivo (Salaün et al., 2021).

Para la inducción de la embriogénesis somática, los reguladores de crecimiento como las auxinas, tienen una función importante en la activación de genes que promuevan la dediferenciación celular, un ejemplo de estos genes es el DOMAIN 29 OF THE LIMITS OF LATERAL ORGANS (*LBD29*), el cual es activado por los factores de transcripción de respuesta a auxina: *ARF7* y *ARF19*, otro ejemplo es el del gen *KRYPTONITE/SUVH4*, el cual codifica para una histona H3 lisina 9

metiltransferasa y mutaciones en él provocan la formación de callo en tejido diferenciado (Elhiti et al., 2013).

SERK es uno de los genes que participa en la adquisición de competencias embriogénicas, porque, la sobreexpresión de dicho gen se observa durante la inducción embriogénica hasta la etapa globular y junto con otros genes como *BBM* y *LEC*, promueve la transición a células embriogénicas a partir de tejidos no embriogénicos (Gulzar et al., 2020).

Además, *BBM* regula la identidad celular y el crecimiento del meristemo de la raíz, de igual forma, la expresión ectópica de *BBM* en plántulas de *A. thaliana* induce embriones somáticos sin estrés exógeno ni tratamiento con reguladores de crecimiento (Salaün et al., 2021). Por otro lado, *LEC2* participa en el mantenimiento de la morfología del suspensor, la progresión a través de la fase de maduración, la especificación de la identidad del cotiledón y suprime la germinación prematura (Gulzar et al., 2020).

Embriogénesis somática *in vitro* en palmas.

De las técnicas de cultivo *in vitro*, la embriogénesis somática se ha utilizado en aproximadamente 20 especies diferentes de palmas por lo que es considerada como la más estudiada y eficiente para propagación *in vitro* de palmeras (Silva-Cardoso et al., 2022). Sin embargo, en la actualidad no existen estudios sobre la propagación *in vitro* de *C. nana*, por lo que su naturaleza biológica para reproducirse sexualmente y también por la vía vegetativa es una condición favorable para que esta especie sea un modelo biológico para explorar condiciones artificiales que induzcan embriogénesis somática.

Durante la embriogénesis somática, las células somáticas diferenciadas se convierten a células totipotentes mediante una reprogramación de actividades celulares, lo que conduce a que adquieran competencia embriogénica, una vez adquirida dicha competencia pasan por los diferentes estadios: pro embrionario, o globular, corazón, torpedo y embrión cotiledónar (Gulzar et al., 2020). En plantas monocotiledóneas hay un proceso de transición del embrión globular, en el cual,

este último se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por las fases de torpedo y coleoptilar, sin pasar por la fase corazón (Freide-Seijo, 2003).

Cabe señalar que el proceso de embriogénesis somática puede afectarse por diferentes factores como el tipo de medio, tipo de explante, estado de desarrollo de este, reguladores de crecimiento, genotipo de la planta, uso de antioxidantes y de algunos otros aditivos como vitaminas y aminoácidos (Viñas & Jiménez, 2011). En palmas se ha utilizado tejido inmaduro ya que es importante que los explantes tengan regiones meristemáticas (Viñas & Jiménez, 2011), sin embargo, también se ha reportado el uso de hojas por laboratorios comerciales en Malasia, para obtener embriones somáticos de palma aceitera, ya que la obtención de explantes es sencilla y el material es abundante (Ooi et al., 2021). Otro de los tejidos con potencial embriogénico son las inflorescencias maduras e inmaduras, usadas en palma datilera, así como, embriones cigóticos maduros e inmaduros en cocotero (Solangi et al., 2020; Kalaipandian et al., 2021).

Técnicas histológicas en la embriogénesis somática

La embriogénesis somática por sus similitudes con la embriogénesis cigótica es considerada como un modelo en estudios moleculares, fisiológicos y de desarrollo de las plantas, más aún en especies en donde los eventos que conforman el proceso embriogénico están poco claros (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020). Con los análisis histológicos se pueden identificar los eventos de división celular y diferenciación celular en cada una de las etapas que conllevan a la formación de embriones (De Almeida et al., 2012). Dado que, con los estudios histológicos es posible comprender mejor el proceso embriogénico son considerados como una herramienta eficiente en la optimización de protocolos de regeneración *in vitro* (Gatica-Arias et al., 2019). Otras de las ventajas de este tipo de análisis es que se puede identificar marcadores en tejidos con potencial embriogénico (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020).

Anteriormente se han realizado estudios histológicos en especies de palmas como: *Acrocomia aculeata* (Meira et al., 2019), *Syagrus oleracea* (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020), *Euterpe precatoria* (Mart.) (Ferreira et al., 2022 A), *Cocus nucifera* L.

(Welewanni et al., 2020), *Elaeis guineensis* Jacq (Vilela et al., 2019) y *Phoenix dactylifera* L. (Al-Khayri et al., 2017), donde se ha dilucidado la ontogénesis de la formación de callo embriogénico y la formación de embriones somáticos, se han caracterizado los tejidos embriogénicos, así como, el establecimiento de protocolos en palmas con importancia comercial.

Uso de la Microscopía de fluorescencia.

Para desarrollar un mejor protocolo de embriogénesis somática, los análisis histológicos son una herramienta útil que acompañada con herramientas más sofisticadas como la microscopía de fluorescencia resulta en la identificación más eficiente de los tejidos implicados en este proceso (Elpe et al., 2018).

La fluorescencia ocurre cuando una muestra que tiene algún compuesto fluorescente (ya sea que los posea de forma natural o esta haya sido tratada con alguno) es iluminada con una luz (luz excitante) la cual es absorbida por este compuesto, provocando un incremento de su estado energético, que para volver a su estado basal, la muestra “expulsa” ese exceso de energía en forma de luz, sin embargo el color de esta luz emitida es diferente a la de la luz de excitación, porque una parte de la energía se pierde en forma de calor, resumiendo, la longitud de onda emitida es más larga que la longitud de onda de excitación (Datta et al., 2020).

Con la microscopía de fluorescencia es posible la identificación de los tejidos y su constitución, sin teñir (debido a la autofluorescencia de compuestos como clorofila o lignina), o bien utilizando algún fluoróforo o un colorante fluorescente como la safranina (Pegg et al., 2021). Este compuesto emite fluorescencia bajo excitación a una intensidad máxima de 570 nm sin importar el tipo de célula analizada, mientras que, el espectro de emisión es de 520-600 nm (Baldacci-Cresp et al., 2020).

Con la microscopía de fluorescencia se ha descrito la anatomía de diferentes partes de varias plantas como: las paredes celulares de *Pinus yunnanensis* (Ji et al., 2013), hojas de diversos miembros de *Taxaceae* s.l. (Elpe et al., 2018), hojas y tallos de *Lycium humile* (Leal et al., 2023), paredes celulares de embriones somáticos de *Arabidopsis thaliana* (Kurczynska & Godel-Jędrychowska, 2023) y embriones somáticos de *Vitis vinifera* L. (Faure et al., 1996) y de *Syagrus oleracea* (De Araújo

Silva-Cardoso et al., 2020). En palma de soyamiche no existe ningún estudio sobre la embriogénesis somática *in vitro*, por lo que, utilizar técnicas histológicas y microscopía de fluorescencia ayudarían a comprender mejor el proceso embriogénico y sentaría las bases para futuros estudios en esta especie de palma.

LITERATURA CITADA

- Alatorre-Cobos, J., Cano-Carmona, E., y Otero-Zaragoza, R. (2009). Catálogo florístico de las plantas medicinales de la selva baja subcaducifolia de Acapulco en México. *Boletín del Instituto de Estudios Giennenses*, (200), 231-288.
- Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., & Johnson, DV (Eds.). (2017). *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I: Tissue Culture Applications*. Springer New York. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-7156-5>
- Baldacci-Cresp, F., Spriet, C., Twyffels, L., Blervacq, A.S., Neutelings, G., Baucher, M., & Hawkins, S. (2020). A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *The Plant Journal*, 102(5), 1074-1089. <https://doi.org/10.1111/tpj.14675>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2006). Escoba *Cryosophila nana*. <https://enciclovida.mx/especies/156924-cryosophila-nana>
- Cruz-Jiménez, I. (2015). Germinación y crecimiento inicial de tres procedencias de *Cryosophila nana* (Kunth) Blume (Arecaceae) [Tesis de Ingeniería, Universidad del Mar/ Repositorio de la Universidad del Mar]. <http://bibliotecape.umar.mx:8080/TESIS/items/show/115>
- Datta, R., Heaster, T.M., Sharick, J.T., Gillette, A.A., & Skala, M.C. (2020). Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *Journal of biomedical optics*, 25(7), Artículo 071203. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203>
- De Almeida, M., De Almeida, C.V., Graner, E.M., Brondani, G.E., & De Abreu-Tarazi, M.F. (2012). Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach

- palm: a histological study. *Plant Cell Reports*, 31, 1495-1515.
<https://doi.org/10.1007/s00299-012-1264-6>
- De Araújo Silva-Cardoso, I.M., Meira, F.S., Gomes, A.C., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2020). Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. *Physiologia Plantarum*, 168(4), 845-875.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13026>
- Eiserhardt, W., Svenning, J.C., Kissling, D., & Balslev, H. (2011). Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. *Annals of Botany*, 108(8), 1391–1416.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcr146>
- Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(6), 631-642. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>
- Elpe, C., Knopf, P., Stützel, T., & Schulz, C. (2018). Diversity and evolution of leaf anatomical characters in *Taxaceae* sl—fluorescence microscopy reveals new delimitating characters. *Journal of Plant Research*, (131), 125-141.
<https://doi.org/10.1007/s10265-017-0973-x>
- Evans, R. (1995). Systematics of *Cryosophila* (Palmae). *Systematic Botany Monographs*, 46, 1-70. <https://doi.org/10.2307/25027854>
- Faure, O., Aarouf, J., & Nougarede, A. (1996). Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): Embryonic organogenesis. *Annals of Botany*, 78(1), 29-37.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0091>
- Ferreira, J.C.B., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., Meira, R.O., Da Silva Costa, F.H., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022). Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(5), 750-768. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>
- Fior, C., Costa-Calil, A., Dutra de Souza, P., y Schwarz, S. (2018). Impacto de las concentraciones de ANA y sacarosa en el enraizamiento *in vitro* de *Butia*

- odorata* (Barb. Rodr.) Noblick. *Iheringia*, 73(1), 13-21.
<https://doi.org/10.21826/2446-8231201873102>
- Freire-Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4).
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263>
- Gatica-Arias, A., Vargas-Corrales, K., Benavides-Acevedo, M., Bolívar-González, A., Sánchez-Chacón, E., García-Díaz, E., & Valdez-Melara, M. (2019). Morphological and biochemical changes during somatic embryogenesis in mahogany, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 406-418. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i3.34172>
- Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M.Q., Sayeed, R., Mamgain, J., & Ejaz, B. (2020). Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-15.
<https://doi.org/10.1186/s43141-020-00047-5>
- Haynes, J., & McLaughlin, J. (2000). *Edible palms and their uses*. Gainesville: University of Florida.
<https://sfyl.ifas.ufl.edu/media/sfylifasufledu/miamidade/documents/landscape-s-amp-gardening/EdiblePalms.pdf>
- Hemmati, C., Nikooei, M., & Al-Sadi, A.M. (2020). Four decades of research on phytoplasma diseases of palms: a review. *International Journal of Agriculture and Biology*, 24(3), 631-644. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1480>
- Ji, Z., Ma, J.F., Zhang, Z.H., Xu, F., & Sun, R.C. (2013). Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of *Pinus yunnanensis* determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy. *Industrial Crops and Products*, (47), 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.006>
- Kalaipandian, S., Mu, Z., Kong, E.Y.Y., Biddle, J., Cave, R., Bazrafshan, A., & Adkins, S.W. (2021). Cloning Coconut via Somatic Embryogenesis: A Review of the Current Status and Future Prospects. *Plants*, 10(10), Artículo 2050.
<https://doi.org/10.3390/plants10102050>

- Kurczynska, E., & Godel-Jędrychowska, K. (2023). Apoplastic and Symplasmic Markers of Somatic Embryogenesis. *Plants*, 12(10), Artículo 1951. <https://doi.org/10.3390/plants12101951>
- Leal, M., Mercado, M.I., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Ponessa, G.I., y Isla, M.I. (2023). Morfo-anatomía e histoquímica de órganos vegetativos de *Lycium humile* (Solanaceae): rasgos adaptativos a humedales salinos de altura. *Darwiniana, Nueva Serie*, 466-484. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2023.112.1151>
- Ley-López, J.M., & Ávalos, G. (2017). Propagation of the palm flora in a lowland tropical rainforest in Costa Rica: fruit collection and germination patterns. *Tropical Conservation Science*, 10. <https://doi.org/10.1177/19400829177407>
- Luis, Z.G., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2014). An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (118), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0500-x>
- Luna-José, A.D., y Rendón-Aguilar, B. (2008). Recursos vegetales útiles en diez comunidades de la sierra madre del sur, Oaxaca, México. *Polibotánica*, 26, 193-242. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62102611>
- Mayes, S. (2020). The History and Economic Importance of the Oil Palm. In: Ithnin, M., Kushairi, A. (eds) *The Oil Palm Genome*. Compendium of Plant Genomes. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22549-0_1
- Meira, F.S., Luis, Z.G., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2019). Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. *Flora*, (250), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.11.011>
- Moore, R. (2006). *Cryosophila: A True Survivor*. Growing Stimulants. Packing and Shipping Small Palms. *Growing Palms Horticultural and practical advice for the enthusiast*, 50(1), 5-10. https://www.vbgardens.org/pdf/growing_palms_50_1.pdf
- Olivera-Triste, MT (2020). Identificación de biomoléculas de diferentes plantas con actividad hipoglucemiante [Tesis de maestría/ Universidad Autónoma Agraria

<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/47589>

- Ooi, S.E., Feshah, I., Nuraziyah, A., Sarpan, N., Ata, N., Lim, C.C., & Ong-Abdullah, M. (2021). Leaf transcriptomic signatures for somatic embryogenesis potential of *Elaeis guineensis*. *Plant cell reports*, 40(7), 1141-1154. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02698-1>
- Pegg, T.J., Gladish, D.K., & Baker, R.L. (2021). Algae to angiosperms: Autofluorescence for rapid visualization of plant anatomy among diverse taxa. *Applications in Plant Sciences*, 9(6), e11437. <https://doi.org/10.1002/aps3.11437>
- Salaün, C., Lepiniec, L., & Dubreucq, B. (2021). Genetic and molecular Testigo of somatic embryogenesis. *Plants*, 10(7), 1467. <https://doi.org/10.3390/plants10071467>
- Sander, N.L., Pulido-Silva, M.T., y Da Silva, C.J. (2023). Uso de las palmas en Latinoamérica. In *CRV* (250). <https://doi.org/10.24824/978652514377.4>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2019). *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* (2010, modificada a partir del 21 de noviembre de 2013 y 14 de noviembre de 2019). https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc.tab=0
- Segura, A.A., Duno, R., Irabien, L.M.D.C.C., y Balslev, H. (2014). Importancia ecológica de las palmas (Arecaceae) en un gradiente ambiental a lo largo del estado de Quintana Roo, México. *Desde el Herbario CICY*, 6, 9–1. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Senado de la República. (14 de Marzo de 2019). Plantean potenciar el cultivo de la palma de coco en el país. *Senado de la República coordinación de comunicación social*. <http://comunicacion.senado.gob.mx/index.php/informacion/boletines/44097-plantean-potenciar-el-cultivo-de-la-palma-de-coco-en-el->

[pais.html#:~:text=En%20M%C3%A9xico%2C%20destac%C3%B3%2C%20la%20palma,nacional%2C%20con%20178.2%20mil%20toneladas.](#)

- Silva-Cardoso, I.M.D.A., Meira, F.S., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022). The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.] Becc. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44 (87). <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>
- Solangi, N., Abul-Soad, A., Markhand, G., Jatoi, M., Jatt, T., & Mirani, A. (2020). Comparison among different auxins and cytokinins to induce date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic embryogenesis from floral buds. *Pakistan Journal Botany*, 52(4), 1243-1249. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-4\(30\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-4(30))
- Suárez-Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Universidad de Córdoba.
- Toledo-Espinosa, X.E. (2014). Micropropagación y genética del paisaje de *Acrocomia aculeata* (Jacq. Lodd. ex Mart) en Chiapas, conocimiento para su manejo [Tesis de Maestría/ Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.]. <http://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/445>
- Vegas, A., Ortega, D., Gualoto, W., Paredes, E., Rebolledo, E., Quintero, L., y Ortega, J. (2016). Respuesta de la palma africana híbrido iniap-ternera cultivada in vitro según el tipo de explante y niveles de ácido naftalenacético. *Bioagro*, 28(3), 193-200. <http://ve.scielo.org/pdf/ba/v28n3/art06.pdf>
- Vegas, A., Molleda, P., Ortega, D., Paredes, E., Gualoto, W., Quintero, L., y Baque, W. (2019). Efecto del sorbitol, manitol y la sacarosa en la germinación in vitro de embriones de palma africana. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 36, 247-264.
- Vilela, M.S.P., Santos, R.S., Stein, V.C., & Paiva, L.V. (2019). Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Revista árvore*, 43. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-90882019000100006>
- Villaseñor, J.L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(3), 559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>

- Viñas, M., y Jiménez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (*Arecaceae*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 229-242.
- Welewanni, I., Perera, C., Jayasekera, A., & Bandupriya, D. (2020). Recovery, histological observations and genetic integrity in coconut (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli cryopreserved using encapsulation-dehydration procedure. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 48(2), 175 – 186. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v48i2.9538>
- Yao, G., Zhang, Y.Q., Barrett, C., Xue, B., Bellot, S., Baker, W.J., & Ge, X.J. (2023). A plastid phylogenomic framework for the palm family (*Arecaceae*). *BMC Biology*, 21(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01544-y>
- Zambrano-Arteaga, J., Hoyos-Sánchez, R., y Chicaiza-Finley, D. (2022). Evaluación de la germinación de semillas de palma de iraca (*Carludovica palmata*) en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. *Caldasia*, 44(2), 1-28. <https://www.jstor.org/stable/48676821>

VI. Obtención de embriones somáticos a partir del cultivo *in vitro* de callos de palma de soyamiche [*Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon]

RESUMEN

En nuestro país la palma de soyamiche, es utilizada con fines alimenticios, medicinales y en la elaboración de artesanías. Sin embargo, la destrucción de su hábitat y los problemas de propagación convencionales asociados con palmeras, han causado que se encuentre en riesgo de desaparecer. La aplicación de técnicas como la embriogénesis somática *in vitro*, permiten rescatar, multiplicar y conservar diferentes especies amenazadas. Además, esta técnica se ha aplicado exitosamente en palmas siendo utilizada, en esquemas eficientes para fines de su propagación. Para el caso de la palma soyamiche, hasta esta fecha, no hay reportes sobre su propagación *in vitro*, por lo que fue necesario establecer y evaluar las todas condiciones *in vitro* que pudieran promover la embriogénesis somática indirecta (callos). La obtención de callos embriogénicos, a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros, se obtuvo con 5.0 mg L⁻¹ de TDZ, a los 70 días, en los callos embriogénicos clasificados. Posteriormente, la diferenciación de embriones fue posible combinando 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de kinetina, porque lo anterior estimula la formación de un gradiente de síntesis de auxinas, lo que promueve la formación de embriones somáticos, estos últimos se corroboraron por medio de histología. En la siguiente etapa, los embriones somáticos cultivados con 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D formaron callos, pero con una dosis de 1.0 mg L⁻¹ se logró la maduración y conversión a plántulas, sin embargo, estas últimas no desarrollaron raíces, debido a la presencia de componentes como el carbón activado, el método o duración de la fase de maduración, hace necesario realizar más pruebas experimentales y su análisis. Los resultados obtenidos en esta investigación, permitieron establecer las condiciones *in vitro* que permiten tanto la callogénesis, así como embriogénesis somática de palma de soyamiche cultivando *in vitro* los embriones cigóticos como explante.

Palabras claves: callo embriogénico, embriones somáticos, reguladores de crecimiento, diferenciación, fases embriogénicas.

ABSTRACT

The soyamiche palm is used for food, medicinal purposes and in the production of handicrafts. However, habitat destruction and conventional propagation problems associated with palm trees have caused it to be at risk. Techniques such as somatic embryogenesis make it possible to rescue, multiply and conserve threatened species. Furthermore, in palms it is the most used, studied and efficient technique for propagation purposes. As it is a species that had not been studied, it is necessary to establish in vitro conditions that promote indirect somatic embryogenesis. Callus induction was achieved with 5.0 mg L⁻¹ of TDZ, after 70 days callus with embryogenic characteristics were presented. Subsequently, embryo formation was possible with the lowest dose of 2,4-D and kinetin, this is because low doses stimulate the formation of an auxin gradient, resulting in embryo formation. In the next stage the somatic embryos with the lowest dose of 2,4-D formed callus, but with a dose of 1 mg L⁻¹ maturation and conversion to seedlings was achieved, however, the latter did not present roots, possibly by components such as activated carbon, the method or duration of the maturation phase, so further analysis is necessary. With what is reported here, it was possible to establish the in vitro conditions that allow somatic embryogenesis of soyamiche palm using zygotic embryos as explants.

Keywords: embryogenic callus, somatic embryos, growth regulators, differentiation, embryogenic phases.

Thesis in Agricultural Biotechnology Sciences, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Ma. Guadalupe Mayo Mayo

Advisor: Dr. José Luis Rodríguez de la O

INTRODUCCIÓN

La familia *Arecaceae* está formada por aproximadamente 2600 especies, de estas se ha reportado que en el país existen 99 especies de palmas de las cuales el 37.7% son endémicas (Sander et al., 2023; Yao et al., 2023). Sin embargo, 62 especies (endémicas y no endémicas) se encuentran amenazadas o bajo protección especial. Una de estas palmas es *Cryosophila nana* o palma de soyamiche que se encuentra en riesgo debido a la destrucción de su hábitat y sobreexplotación (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006).

La palma de soyamiche es utilizada principalmente en comunidades rurales para producir artesanías, en la construcción de casas y escobas, con fines de ornato, medicinal y alimentario (Luna-José & Rendón-Aguilar, 2008; Alatorre-Cobo et al., 2009). También en comunidades de Oaxaca los botones florales se consumen hervidos, sus frutos se fermentan para obtener una bebida alcohólica y de esta palma es posible obtener palmito amargo el cual se puede consumir solo o como ingrediente para ensaladas (Haynes & McLaughlin, 2000; Olivera-Triste, 2020).

De las partes de la palma de soyamiche mencionadas anteriormente solo se ha analizado la fitoquímica de los botones florales, en ellos se encontraron compuestos como catequinas, avenantramidas y polifenoles, que tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas y antifúngicas (Olivera-Triste, 2020).

Sin embargo, aunque esta especie de palma tiene un potencial económico no existen programas para su conservación y aunado a esto, las especies de palmas son conocidas por ser difíciles de propagar de manera convencional debido a que tiene semillas recalcitrantes, tiempos de germinación largos, porcentajes de germinación bajos, limitada producción de brotes axilares (en caso de que los haya), algunas especies como el cocotero y la palma aceitera solo se propagan por semillas (Ley-López & Ávalos, 2017; Vegas-García et al., 2019).

Es debido a estos problemas que se han buscado otras alternativas que permitan su propagación, como técnicas de cultivo *in vitro*. De estas la embriogénesis somática es la más estudiada y efectiva para propagación de palmas porque se ha probado con éxito en más de 20 especies de palmeras (Silva-Cardoso et al., 2022).

La embriogénesis somática consiste en la dediferenciación de células especializadas para formar embriones, cuyo proceso es muy similar a la embriogénesis cigótica, pero sin haber fusión de gametos (Ree & Guerra, 2015). De manera general el proceso de embriogénesis somática implica dos etapas: primero las células somáticas se someten a dediferenciación y rediferenciación para adquirir la capacidad embriogénica, y por último las células embriogénicas forman

embriones somáticos que posteriormente se desarrollan hasta convertirse en plantas completas (Yan et al., 2020).

Esta vía de regeneración *in vitro* se divide en directa e indirecta en la primera los embriones se forman directamente a partir del tejido del explante, mientras que en la segunda existe la formación de callo, este es una masa de células indiferenciadas que a partir de las mismas se van a formar los embriones somáticos (Liu et al., 2021). La embriogénesis somática indirecta tiene una mayor eficacia de propagación que la vía directa y pueden aplicarse técnicas de congelación durante períodos más largos, lo que hace posible sentar una base sólida para la industrialización del proceso (Zhang et al., 2021).

El proceso de embriogénesis somática es inducido generalmente por reguladores de crecimiento, comúnmente por auxinas o citocininas que tiene un papel importante en el crecimiento, diferenciación y regeneración *in vitro* de plantas (Hassan et al., 2021). Sin embargo, durante el proceso embriogénico también influyen otros factores, como el genotipo de la planta, el medio de cultivo, el grado de diferenciación tisular, el estado nutricional y fisiológico del explante, además del tamaño y tipo del explante (Oliveira et al., 2022).

Uno de los explantes más utilizados para la embriogénesis somática en palma son los embriones cigóticos porque, tienen una capacidad regenerativa alta, están libres de patógenos, su disponibilidad y abundancia también es alta, su recolección y transporte es fácil, así como su grado de uniformidad fisiológica de los embriones cigóticos es alto, por todo lo anterior se utilizan como modelo para el desarrollo de protocolos de embriogénesis somática en especies sin protocolos establecidos (Ferreira et al., 2022a). En este contexto, el objetivo de este estudio fue establecer las condiciones *in vitro* para promover la embriogénesis somática indirecta a partir de embriones cigóticos inmaduros de palma de soyamiche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron como explante embriones cigóticos obtenidos a partir de semillas maduras de *Cryosophila nana*, colectadas en la comunidad de “El Mezón” ubicada en el municipio de Ayutla de los Libres (latitud 16°50'44"N y longitud 99°3'29"W) en el estado de Guerrero. Las semillas se trasladaron al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en la Universidad Autónoma Chapingo.

Desinfestación de los explantes

Las semillas maduras se lavaron con una solución de agua con jabón y Tween 20, durante 10 min. Posteriormente en la campana de flujo laminar, se eliminó la cubierta, para después sumergirse a una solución de alcohol etílico al 70 % (v/v) durante 3 min, seguido de una inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) durante 15 min. Enseguida, se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril. Después, las semillas se abrieron con una prensa manual de acero inoxidable para extraer los embriones cigóticos, que posteriormente, fueron sembrados en medio basal Murashige y Skoog (1962) (Sigma, St. Louis, MO) con diferentes reguladores de crecimiento dependiendo de la etapa de la embriogénesis somática (Cuadro 1).

Inducción de callos *in vitro*.

Para la fase de inducción de callos, los embriones cigóticos fueron colocados en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) (Sigma, St. Louis, MO) al 100 %, suplementado con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina (ICN Pharmaceuticals, Plainview, N.Y), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol (Sigma, St. Louis, MO), 100 mg L⁻¹ de L-cisteína (Sigma, St. Louis, MO), 50 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona, 30 g L⁻¹ de sacarosa y se probaron dos tratamientos: 3.5 y 5.0 mg L⁻¹ de tidiazurón (TDZ) (Cuadro 1).

Para todos los medios de esta y las siguientes etapas, el pH del medio se ajustó a 5.7±0.1 antes de adicionar 7.0 g L⁻¹ de Bacto TM Agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA) para su solidificación y fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 25 minutos a 15 kg cm⁻² de presión.

Para la etapa de inducción de callos, los embriones cigóticos inmaduros fueron sembrados en frascos de vidrio tipo Gerber de 113 g de capacidad y fueron

colocados en una incubadora a 25 °C en total oscuridad. Se sembraron tres explantes por frasco donde cada explante fue una unidad experimental.

Formación de embriones somáticos

Para la obtención de embriones somáticos, los callos obtenidos en la fase anterior fueron subcultivados en un medio con sales MS (Sigma, St. Louis, MO) al 100 % suplementado con 100 mg L⁻¹ de myo-inositol (Sigma, St. Louis, MO), 50 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (MCB, Norwood, Ohio), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.40 mg L⁻¹ de tiamina (ICN Pharmaceuticals, Plainview, N.Y), 400 mg L⁻¹ de glutamina (Merck, Darmstadt), 100 mg L⁻¹ de arginina (Merck, Darmstadt), 100 mg L⁻¹ asparagina (Merck, Darmstadt), 100 mg L⁻¹ de L- cisteína (Sigma, St. Louis, MO), 10 g L⁻¹ de caseína hidrolizada (Merck, Darmstadt) y 1 g L⁻¹ de carbón activado (HYCEL, Ciudad de México). Para los diferentes tratamientos se utilizó una combinación de kinetina (KIN) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). También se implementaron tratamiento con kinetina y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico (picloram) combinados a diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Los callos fueron cultivados *in vitro* en frascos de vidrio de 113 g de capacidad con 20 ml de medio por recipiente, se colocaron tres callos por frasco y cada callo fue considerado una unidad experimental. Una vez realizado el cultivo, fueron colocados en un cuarto de cultivo a 25 °C con una intensidad luminosa de 12.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad.

Maduración de embriones somáticos

Los embriones somáticos obtenidos en la etapa para formar embriones fueron separados por fase de embriogénesis (globular, torpedo y posibles embriones). Para esto se utilizó un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi DV4), pinzas de disección y hoja de bisturí, este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar.

Los embriones fueron colocados en medio con sales MS (Sigma, St. Louis, MO) al 100 % suplementado con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina (ICN Pharmaceuticals, Plainview, N.Y), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol (Sigma, St. Louis, MO), 100 mg L⁻¹ de L-cisteína (Sigma, St. Louis, MO), 100 mg L⁻¹ de glutamina (Merck, Darmstadt), 50 mg L⁻¹

polivinilpirrolidona, 1 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada (Merck, Darmstadt) y 40 g L⁻¹ de sacarosa. Para los diferentes tratamientos se utilizó 2,4-D a diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Para esta etapa los embriones fueron sembrados en tubos de vidrio con 20 ml de medio por tubo, donde cada tubo consistió en una unidad experimental y se realizaron diez repeticiones por tratamiento. Los embriones fueron colocados en un cuarto de cultivo a 25 °C, con una intensidad luminosa de 18.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para las etapas inducción de callo y obtención de embriones. En la etapa de maduración se utilizó un diseño de bloques de un factor (nivel de diferenciación) con tres niveles (estructuras globulares, estructuras tipo torpedo y posibles embriones).

Las variables necrosamiento, nivel de diferenciación y nivel de respuesta, durante las etapas de inducción de callo y formación de embriones, fueron evaluadas mediante una regresión ordinal, sus respectivas categorías se muestran en la Cuadro 2. Para el peso de los callos se utilizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey con un $\alpha=0.05$. Mientras que la diferenciación inicial y final de la etapa maduración fueron analizadas utilizando un análisis descriptivo. Se utilizó el software estadístico R versión 4.3.1 para el análisis estadístico de los datos.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en cada una de las etapas de la embriogénesis somática en palma de soyamiche

Etapa del proceso de embriogénesis	Tratamientos	Reguladores (mg L ⁻¹)
Inducción de callo	Testigo	-
	T1	3.5 TDZ
	T2	5.0 TDZ
Formación de embriones somáticos	Testigo	-
	EMD1	KIN [0.5] + 2,4-D [0.1]
	EMD2	KIN [1.0] + 2,4-D [0.5]
	EMD3	KIN [3.0] + 2,4-D [1.5]
	EMP1	KIN [0.5] + Picloram [0.1]
	EMP2	KIN [1.0] + Picloram [0.5]
	EMP3	KIN [3.0] + Picloram [1.5]
	Testigo	-
Maduración de embriones somáticos	Mad1	2,4-D [0.3]
	Mad2	2,4-D [1.0]
	Mad3	2,4-D [3.0]

Cuadro 2. Categorías de las variables cualitativas en cada una de las etapas o fases de la embriogénesis somática en palma de soyamiche.

Etapa del proceso de embriogénesis	Variable	Categorías
Inducción de callo	Nivel de diferenciación	1: Sin callo, 2: callo indiferenciado, 3: callo con estructuras globulares, 4: callo con estructuras tipo torpedo
	Nivel de respuesta	1: Sin respuesta (tejido muerto), 2: con aparente respuesta (sin cambios

		Necrosamiento	físicos, pero tejido vivo), 3 (formación de callo) 1: No necrosado, 2: muy poco necrosado, 3: mitad necrosado, 4: totalmente necrosado
Formación de embriones	Nivel de diferenciación		1: Callo indiferenciado, 2: estructuras globulares, 3: estructuras tipo torpedo, 4: posibles embriones
	Nivel de respuesta		1: Sin respuesta (tejido muerto), 2: con aparente respuesta (sin cambios físicos del callo). 3: con respuesta (formación de embriones)
Maduración de embriones	Nivel de respuesta inicial		2: Estructuras globulares, 3: estructuras tipo torpedo, 4: posibles embriones
	Nivel de diferenciación final		1: callo, 2: estructuras globulares, 3: estructuras tipo torpedo, 4: posibles embriones, 5: plántulas.

*Las categorías de la variable necrosamiento no cambiaron en ninguna de las fases.

RESULTADOS

Inducción de callos

Con la finalidad de iniciar el proceso de embriogénesis somática indirecta se utilizaron embriones cigóticos extraídos de semillas maduras de palma de soyamiche como explante. Estos fueron cultivados en medio MS con 2,4-D y TDZ a diferentes concentraciones (Cuadro 1), sin embargo, ninguno de los tratamientos con 2,4-D formó callo (datos no mostrados). Por otro lado, se observó que los callos se formaron a partir de la plúmula (Figura 2) y solo en los tratamientos con TDZ. En la Figura 3 se muestran que los tipos de callo obtenidos eran beige esponjosos con nódulos en la superficie (Figura 3 A), blancos esponjosos con formación de estructuras embrionarias (Figura 3 B) y friables translúcidos (Figura 3 C), después de 70 días de cultivo. Se determinó que solo los callos de textura esponjosa eran embriogénicos, en este tipo de callo se formaron nódulos en la superficie, (Figura 3 B, flecha) también se encontraron estructuras globulares y tipo torpedo (Figura 3 C). Sin embargo, los callos friables no fueron embriogénicos porque cuando se pasaron al medio para formar embriones no se formaron estructuras embriogénicas.

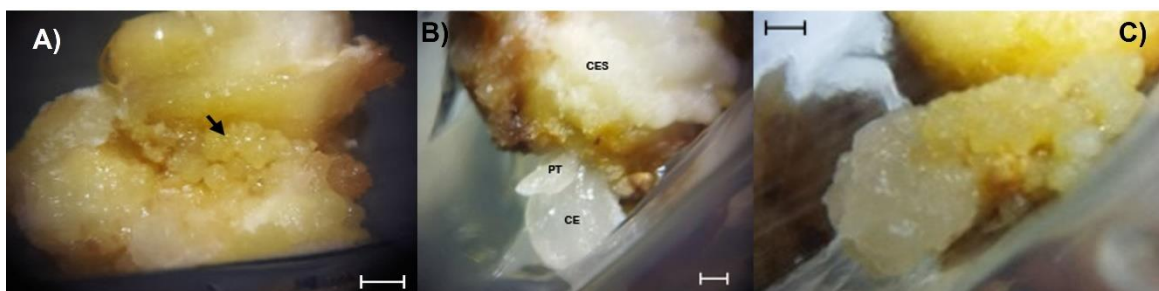


Figura 3. Tipos de callos obtenidos en medio MS con TDZ después de 70 días de cultivo. A) Callo esponjoso color beige con formación de estructuras pro embrionarias en su superficie (flecha). B) Callo blanco esponjoso con estructura tipo torpedo visible. C) Callo friable translúcido formado a partir del explante.

Para obtener el incremento de peso o de masa de los callos obtenidos, estos fueron colocados en una balanza de tipo analítico a los 0, 42 y 84 días de cultivo. De acuerdo con el análisis de varianza se obtuvieron diferencias significativas en los pesos de los callos para los diferentes tratamientos. A los cero días no existen

diferencias significativas porque correspondía al peso del explante (Cuadro 3). Por otro lado, para los días 42 y 84 el valor de P, al ir disminuyendo muestra que hay diferencias significativas entre los pesos para los distintos tratamientos y dicha variable aumenta conforme pasan los días, (Cuadros 4 y 5).

De igual forma en la Cuadro 6 se observa que una dosis de 5.0 mg L⁻¹ de TDZ (T2) es donde el aumento en el peso de los callos es mayor en comparación con el Testigo (T0) y con 3.5 mg L⁻¹ de TDZ (T1), conforme transcurre el tiempo. Esto quiere decir que a mayor dosis de TDZ y mayor número de días hay un aumento en el peso de los callos. Por lo que, en palma de soyamiche es necesario una dosis alta de regulador de crecimiento para obtener callos con pesos altos.

Cuadro 3. Análisis de varianza de los pesos de los callos a los cero días de cultivo para los diferentes tratamientos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr (>F)	Significancia
Tratamientos	2	0.0008	0.0004	3.1477	0.0590	NS
Residuales	27	0.0034	0.0001			

$\alpha = 0.05$

Se realizó una regresión ordinal para el análisis de las variables cualitativas, los resultados obtenidos se muestran en los cuadros como razón de probabilidad. Una razón de probabilidad indica, en este caso, cuanto es más probable que el explante o callo pase de una categoría a otra (Cuadro 2). En la Cuadro 7 se observa que es 1.952 y 1.719 veces más probable que los callos pasen de una categoría de no necrosado a un poco, mitad o totalmente necrosado en los tratamientos con TDZ al 3.5 mg L⁻¹ y 5 mg L⁻¹ respectivamente, es decir, que el regulador de crecimiento provoca el necrosamiento de los callos, sin embargo, es más probable que estos se necrosen con 3.0 mg L⁻¹ de TDZ (Cuadro 7).

Por otro lado, se observa que es 75607340 y 89026793 veces más probable que los explantes pasen de la categoría sin callo a callo indiferenciado, callo con estructuras globulares o callo con estructuras tipo torpedo en los tratamientos con TDZ con 3.5 mg L⁻¹ y 5.0 mg L⁻¹ respectivamente.

Cabe destacar que estas razones de probabilidad fueron muy altas porque, en el tratamiento Testigo que es el valor de referencia no hubo formación de callo, por lo tanto, al dividir las probabilidades de cada tratamiento (que es donde se obtuvo respuesta) con la del Testigo el resultado es alto.

Cuadro 4. Análisis de varianza del peso de callos a los 42 días de cultivo para los diferentes tratamientos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr (>F)	Significancia
Tratamientos	2	1.3937	0.6968	15.041	4.081e-05	*
Residuales	27	1.2509	0.0463			

* $\alpha = 0.05$

Cuadro 5. Análisis de varianza del peso de los callos a los 84 días de cultivo para los diferentes tratamientos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr (>F)	Significancia
Tratamientos	2	11.5218	5.7609	68.637	2.59e-11	*
Residuales	27	2.2662	0.0839			

* $\alpha = 0.05$

Cuadro 6. Análisis de comparación de medias Tukey del peso de los callos para los distintos tratamientos.

	Número de días del cultivo		
Tratamientos	0	42	84
T0	0.034 ab	0.05 b	0.03 c
T1	0.044 a	0.35 a	0.77 b
T2	0.032 b	0.58 a	1.55 a

T0 (Testigo): sin regulador de crecimiento. **T1:** 3.5 mg L⁻¹ de TDZ. **T2:** 5.0 mg L⁻¹ de TDZ.

Cuadro 7. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de inducción de callo de la embriogénesis somática en palma de soyamiche a los 70 días de cultivo.

Tratamiento	Nivel de respuesta	Niveles de diferenciación	Necrosamiento
T1	1.954	75607341	1.934
T2	2.641	89026793	1.704

T1: 3.5 mg L⁻¹ de TDZ. **T2:** 5.0 mg L⁻¹ de TDZ.

En cuanto al nivel de respuesta del explante, que se refiere a algún cambio visible en la superficie del explante, se observa en la Cuadro 7 que es 1.954 veces más probable que el explante pase de sin respuesta a posible repuesta o respuesta en el tratamiento con 3.5 mg L⁻¹ de TDZ. Sin embargo, al utilizar 5.0 mg L⁻¹ de este mismo regulador es 2.641 veces más probable que pase de la categoría de sin respuesta a posible respuesta o respuesta. Por lo tanto, es necesario el uso de un regulador de crecimiento como lo es el TDZ en concentraciones altas (5.0 mg L⁻¹) para la formación de callo, sin embargo, este regulador puede provocar el necrosamiento del tejido.

Formación de embriones somáticos.

Con la finalidad de formar embriones somáticos a partir de los callos obtenidos en la fase anterior, se probaron diferentes tratamientos, los cuales consistieron en medios de cultivos adicionados con diferentes concentraciones de 2,4-D y su combinación con kinetina (Cuadro 1).

En la Cuadro 8 se muestran las razones de probabilidad para las variables analizadas después de 14 días de cultivar los callos en medio para formar embriones. Para la variable necrosamiento, de acuerdo con la regresión ordinal el tratamiento influye en el necrosamiento de los callos, de todos estos tratamientos. En el tratamiento con 3 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D (EMD3) es 2.226 veces más probable que los callos pasen de la categoría de no necrosado a muy poco, mitad y totalmente necrosado por lo que, es necesario implementar dosis más

bajas de kinetina + 2,4-D o probar otros antioxidantes además del carbón activado y L- cisteína.

Además, se observó que hay un aumento en las veces en que es más probable que los callos pasen de no necrosados a muy poco, mitad o totalmente necrosados con forme pasa el tiempo para los tratamientos con 2,4-D, pero si esta auxina se cambia por picloram el necrosamiento disminuye (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 8. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de formación de embriones de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 14 días después del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento	Niveles de diferenciación	Nivel de respuesta
EMD1	1.079	1.176	1.617
EMD2	2.140	0.843	0.739
EMD3	2.226	1.053	0.418
EMP1	1.146	0.367	0.277
EMP2	1.120	0.278	0.346
EMP3	1.575	0.241	0.201

EMD1: 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMD2:** 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMD3:** 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMP1:** 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de picloram. **EMP2:** 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de picloram. **EMP3:** 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de picloram.

Por otro lado, en el nivel de diferenciación se observó que a los 14 días los tratamientos con 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D (EMD1) y 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D (EMD3) fueron los que presentaron una razón de probabilidad más alta, es decir, que es 1.176 veces y 1.053 veces más probable que los callos pasen de callo indiferenciados a estructuras globulares a estructuras tipo torpedo o posibles embriones en los tratamientos EMD1 y EMD3 respectivamente.

Se observó que a los 42 días (Cuadro 9) de cultivo hubo un aumento en las razones de probabilidades para todos los tratamientos con respecto al tiempo. Sin embargo, para los 56 días (Cuadro 10) en el tratamiento con 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg

L⁻¹ de 2,4-D disminuyó, esto se debe a que algunos embriones somáticos formaron callo.

Cuadro 9. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de formación de embriones de la embriogénesis somática en palma de soyamiche después 42 días del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento	Niveles de diferenciación	Nivel de respuesta
EMD1	1.276	1.368	1.296
EMD2	2.149	1.194	1.136
EMD3	2.285	1.441	0.637
EMP1	1.326	0.984	0.995
EMP2	1.159	0.340	0.494
EMP3	1.736	0.407	0.354

EMD1: 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMD2:** 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMD3:** 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMP1:** 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de picloram. **EMP2:** 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de picloram. **EMP3:** 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de picloram.

Cuadro 10. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de formación de embriones de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 56 días después del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento	Niveles de diferenciación	Nivel de respuesta
EMD1	1.323	1.63	1.757
EMD2	2.197	1.243	1.657
EMD3	2.371	1.246	1.299
EMP1	1.385	1.124	1.349
EMP2	1.322	0.379	0.652
EMP3	1.834	0.427	0.582

EMD1: 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMD2:** 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMD3:** 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. **EMP1:** 0.5 mg L⁻¹ de

kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de picloram. **EMP2:** 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de picloram. **EMP3:** 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de picloram.

Por otro lado, combinando 0.5 mg L⁻¹ de kinetina + 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D (EMD1) presentó una razón de probabilidad más alta para la variable nivel de diferenciación después de 56 días de cultivo. También fue posible identificar que los tratamientos con diferentes dosis de kinetina y 2,4-D en combinación influyen en esta variable porque los valores obtenidos fueron superiores a 1.0 pero cuando se sustituye el 2,4-D por picloram se observó que es 0.379 y 0.427 veces más probable de que los callos pasen de callo indiferenciado a diferenciar estructuras globulares, estructuras tipo torpedo o posibles embriones en los tratamientos con una dosis mayor a 0.1 mg L⁻¹ de picloram combinado con kinetina, es decir, que los tratamientos con 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de picloram (EMP2) y con 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de picloram (EMP3) no presentaron un efecto en el nivel de diferenciación de los callos aun después de 56 días de cultivo (Cuadro 10), por lo que se recomienda el uso de kinetina + 2,4-D (EMD1) en palma de soyamiche.

Por otro lado, el nivel de respuesta se relaciona con el nivel de diferenciación y con el necrosamiento total de los tejidos, esta última puede llegar a causar necrosis del tejido. Se observó que hay un incremento en las razones de probabilidad en todos los tratamientos para la variable nivel de respuesta al aumentar los días de cultivo, pero los tratamientos con 1.0 mg L⁻¹ de kinetina + 0.5 mg L⁻¹ de picloram (EMP2) y con 3.0 mg L⁻¹ de kinetina + 1.5 mg L⁻¹ de picloram (EMP3) tiene los niveles más bajos de respuesta, esto se debe a que presentan razones de probabilidad bajos en el nivel de diferenciación y niveles altos de necrosamiento (Cuadros 8,9 y 10).

Madurez de embriones somáticos.

Después de que se formaron los embriones, estos se separaron por nivel de diferenciación y se cultivaron en diferentes tratamientos, los cuales consistieron en distintas dosis de 2,4-D con la finalidad de lograr la maduración de los embriones somáticos (Cuadro 1). El necrosamiento, se observó a partir de los primeros 14 días de cultivo y fue aumentado hasta los 42 días de cultivo (Cuadros 11,12 y 13).

Cuadro 11. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 14 días después del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento
Mad1	0.725
Mad2	0.874
Mad3	0.498

Mad1: 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad2:** 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad3:** 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Cuadro 12. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 28 días después del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento
Mad1	1.360
Mad2	0.940
Mad3	0.619

Mad1: 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad2:** 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad3:** 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Cuadro 13. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 42 días después del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento
Mad1	2.304
Mad2	1.343
Mad3	1.335

Mad1: 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad2:** 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad3:** 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Para los 63 días de cultivo hubo una ligera disminución en la razón de probabilidad de esta variable en todos los tratamientos (Cuadro 14) debido a que hubo tejido nuevo formado sin evidencia de necrosamiento. La figura 4 muestra las gráficas con los promedios en los niveles de diferenciación (inicial y final) de los embriones

somáticos después de dos, cuatro, seis y nueve semanas de cultivo en el medio de maduración.

Cuadro 14. Regresión ordinal de las variables cualitativas para la fase de maduración de la embriogénesis somática en palma de soyamiche 63 días después del cultivo.

Tratamiento	Necrosamiento
Mad1	2.171
Mad2	1.336
Mad3	1.331

Mad1: 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad2:** 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. **Mad3:** 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

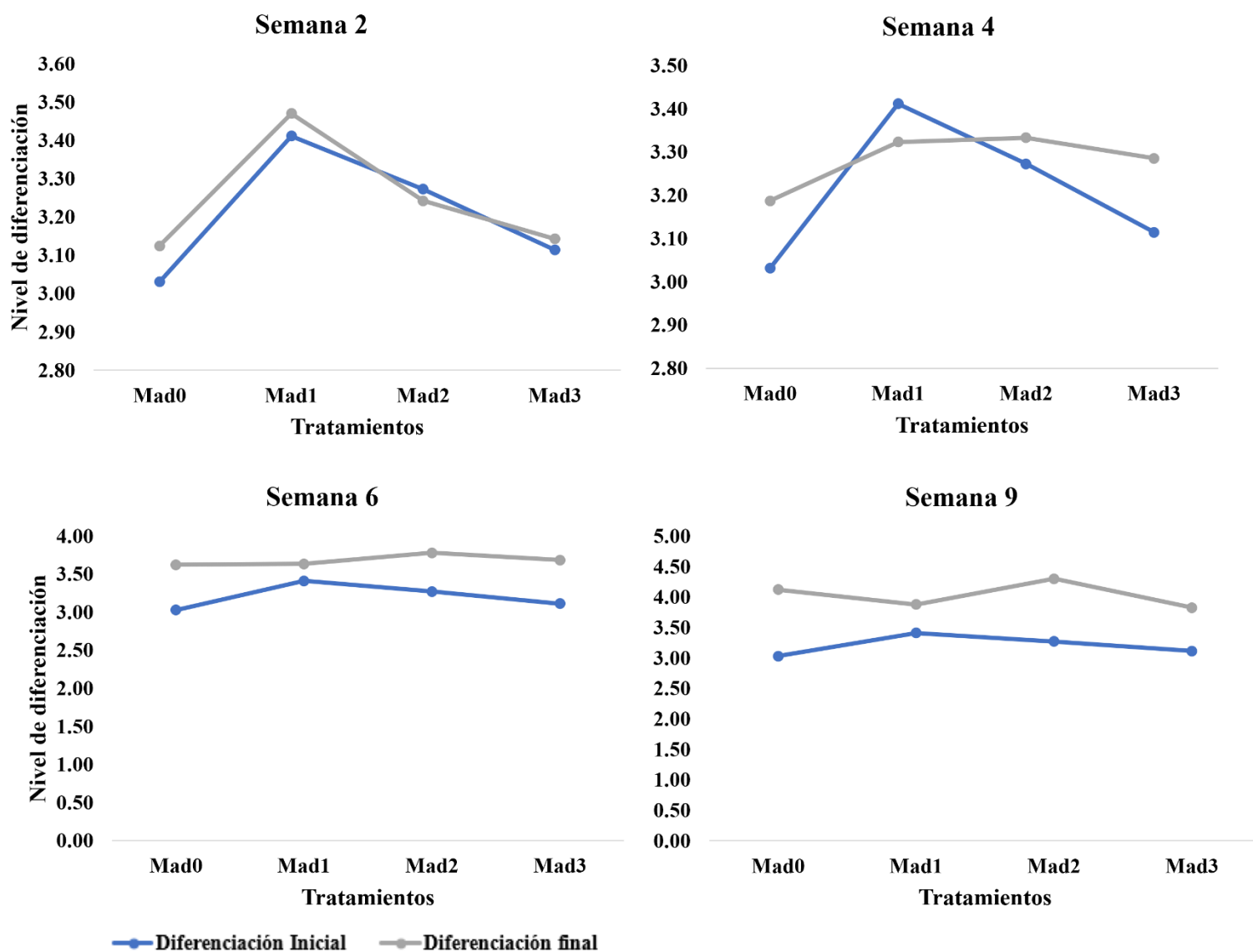


Figura 4. Análisis descriptivo de los niveles de diferenciación de los embriones somáticos de palma de soyamiche cultivados en medio para maduración. A) Los niveles de diferenciación de embriones somáticos de palma de soyamiche después de dos semanas de cultivo, se observó una mejor diferenciación en los tratamientos Testigo (Mad0) y con 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D (Mad1). B) Niveles de diferenciación de embriones somáticos de palma de soyamiche después de cuatro semanas de cultivo en medio de maduración, hubo un mayor nivel de diferenciación en los tratamientos con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D (Mad2) y 3 mg L⁻¹ de 2,4-D (Mad3). C) Niveles de diferenciación de embriones somáticos de palma de soyamiche después de seis semanas de cultivo en medio de maduración, diferenciación similar en los tratamientos, además, no hay interacción de ambas líneas. D) Niveles de diferenciación de embriones somáticos de palma de soyamiche después de nueve semanas de cultivo en medio de maduración, hubo un nivel mayor de diferenciación en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D. Mad0 (Testigo): sin reguladores de crecimiento. Mad1: 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D. Mad2: 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Mad3: 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

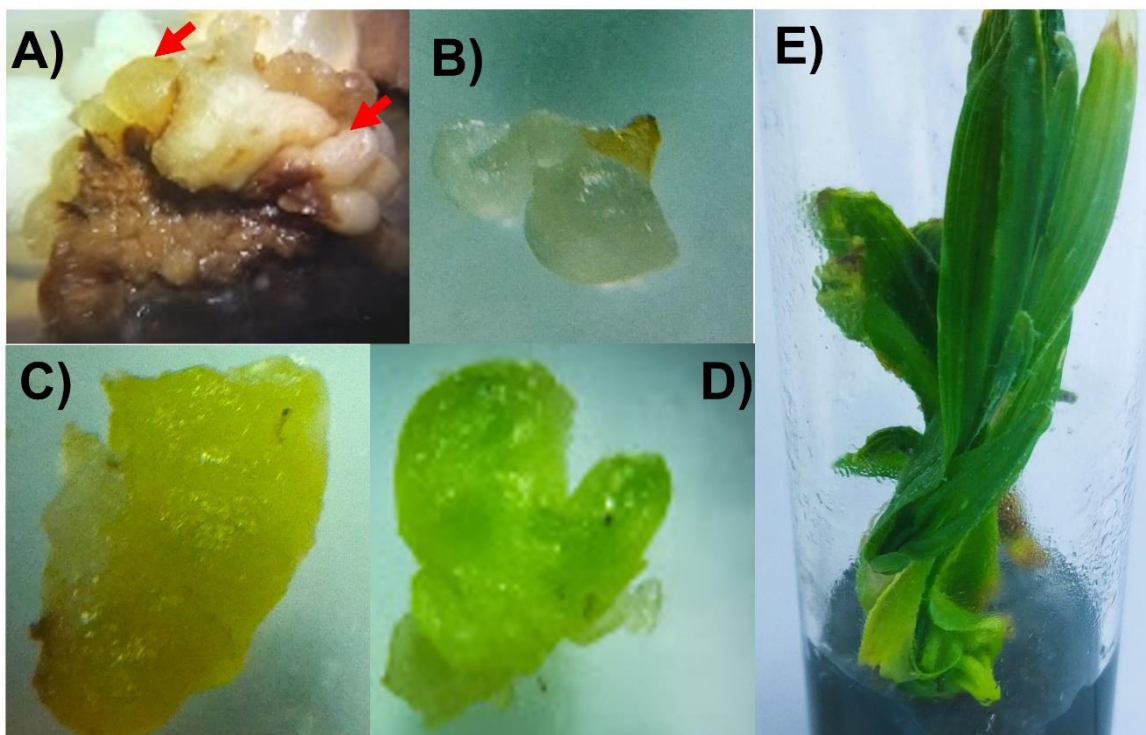


Figura 5. Proceso de embriogénesis somática en palma de soyamiche. A) Embriones en diferentes estadíos (flechas rojas) a los 56 días de cultivo en medio para formar embriones, demuestran la asincronía del proceso embriogénico. B) Estructuras globulares de palma después de 70 días de cultivo. C) Estructuras tipo torpedo obtenidas en la etapa de formación de embriones, después de 70 días de cultivo. D) Posible embrión en estado cotiledón, después de 70 días de cultivo. E) Plántula obtenida en el medio con 1 mg L^{-1} de 2,4-D después de 150 días de cultivo.

Los resultados obtenidos sugieren que durante las primeras dos semanas hay una diferenciación mayor en el tratamiento Testigo (Mad0) y con 0.3 mg L^{-1} de 2,4-D (Mad1) (Figura 4 A). Sin embargo, después de cuatro semanas, en este mismo tratamiento hubo desdiferenciación, pero a dosis de 1.0 mg L^{-1} y 3.0 mg L^{-1} de 2,4-D hay diferenciación (Figura 4 B). También, se necesitan de seis semanas para que en todos los tratamientos haya una diferenciación final mayor con respecto a la inicial (Figura 4 C) y a las nueve semanas se observó que el tratamiento con 1 mg L^{-1} de 2,4-D hay un mejor nivel de diferenciación en los embriones somáticos de palma de soyamiche (Figura 4 D).

En la figura 5 A se observan embriones somáticos en diferentes fases de embriogénesis obtenidos en un mismo callo, esto demuestra que el proceso de embriogénesis somática de soyamiche es asincrónico. También, en la figura 5 B se muestran, estructuras globulares translúcidas y sin evidencia de necrosamiento, estructuras tipo torpedo con forma alargada y de color verde pálido (Figura 5 C) y un posible embrión de color verde en estado cotiledón (Figura 5 D). Aunque hubo conversión a plántulas en el medio de maduración (Figura 5 E) estas no desarrollaron raíces aun después de 150 días de cultivo, pero si hubo crecimiento de la parte aérea de las plántulas.

DISCUSIÓN

Inducción de callo

Para iniciar el proceso de embriogénesis somática vía indirecta se necesita formar callo. Las características físicas de los callos (Figura 3), junto con los niveles de respuesta, se refieren a los cambios físicos del explante. Las características físicas de los callos de palma de soyamiche, coincidieron con las de los callos de *Syagrus oleracea*, estos últimos, tenían una coloración que va de blanco a amarillo, de textura compacta con nódulos en la superficie de los cuales se comenzaron a formar embriones (Silva-Cardoso et al., 2022). De igual forma, Ferreira et al. (2022a) obtuvieron callos de textura esponjosa con superficie nodular en *Euterpe precatoria*, en ambos casos este tipo de callo se determinó como embriogénico. Por lo que, aunque no es común que estos tipos de callos sean embriogénicos, en palmas podría no ser un caso raro.

Algunos callos de la palma de soyamiche mostraron estructuras embriogénicas. Las estructuras embriogénicas observadas durante la fase de inducción de callo, según la hipótesis de Silva-Cardoso et al. (2022) se debe a que ocurrió formación de embriones de manera directa. Además, el TDZ a concentraciones altas (mayores a 10 μM) promueve la formación directa de embriones somáticos (Ghosh et al., 2018).

De acuerdo con la Cuadro 7 en ambos tratamientos el TDZ influyó en la formación de callo (Figura 1 B). Se ha reportado que el TDZ induce la formación de callo

embriogénico en palma datilera, porque cuando se aplica de manera exógena aumenta la producción de zeatina, lo que promueve la división celular (Zayed & Abdelbar, 2017). Además, este regulador de crecimiento puede tener efectos similares a las auxinas y citocininas (Ghosh et al., 2018). Además, en *Roza canina* se reportó que el TDZ aumentó la expresión de los genes *RcCKX2*, *RcCKX3* y *RcPIN1* relacionados con el metabolismo de auxinas y citocininas (Ali et al., 2022).

Por otro lado, el tiempo para formar callo con características embriogénicas en palma de soyamiche (70 días) fue diferente con respecto a otras especies de palma como *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022), *Acrocomia aculeata* (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014), *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022b), *Cocos nucifera* L. (Aguilera-Arango et al., 2019) y *Elaeis guineensis* Jacq. (Panggabean et al., 2021) cuyos callos con características embriogénicas se formaron a los 240, 150, 90, 84 y 134 días respectivamente, por lo que el tiempo de inducción de callo es diferente para cada especie de palma.

De acuerdo con Dar et al. (2021) el peso de los callos se relaciona con la cantidad de callo obtenido. En palma de soyamiche el peso de los callos aumenta con respecto a la concentración del regulador de crecimiento, esta tendencia se ha reportado en *Uncaria tomentosa* (Sánchez-Calvo & Alvarenga-Venutolo, 2015), *Saccharum officinarum* L. (Solangi et al., 2016) y *Satureja khuzistanica* Jamzad (Sahraroo et al., 2014).

El necrosamiento se evidencia por el oscurecimiento del tejido, en los callos obtenidos de la palma de soyamiche se determinó que el regulador de crecimiento influye en la necrosis, de manera similar ocurrió en las especies de palmas *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022) y *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022a) con inflorescencias y embriones cigóticos como explante respectivamente, para ambos casos el necrosamiento fue alto en los tratamientos con reguladores de crecimiento. El necrosamiento ocurre cuando hay una producción excesiva de polifenoles en respuesta a algún tipo de estrés inducido (Ferreira et al., 2022b). Por lo que, el estrés inducido por los reguladores de crecimiento es el responsable de la necrosis en los callos de palma de soyamiche.

Sin embargo, a pesar del necrosamiento en los explantes de palma de soyamiche, dicho necrosamiento no parece ser un inconveniente en la formación de callo, similar a lo que ocurrió en las especies *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022b) y *Elaeis guineensis* (Almeida et al., 2019) donde se utilizaron tejidos foliares como explante. De acuerdo con Ferreira et al. (2022b), esto se debe a que la posible liberación de compuestos fenólicos en los tejidos cultivados podría promover la embriogénesis somática durante sus etapas iniciales en la palma *Euterpe precatoria*, sin embargo, se necesitan más estudios.

No obstante, es importante Testigoar los niveles de necrosamiento porque de no hacerlo podría conducir a la muerte celular del tejido (Ferreira et al., 2022b; Almeida et al., 2019), para esto es necesario realizar estudios con diferentes antioxidantes como: carbón activado, utilizado en las especies *Elaeis guineensis*, var. Pisifera (Almeida et al., 2020), *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022), *Elaeis guineensis* Jacq. (Gomes et al., 2024), entre otras. También, el ácido ascórbico y ácido cítrico se han implementado en *Phoenix dactylifera* L. (Zein El Din et al., 2022) con la finalidad de determinar cuál es necesario utilizar en palma de soyamiche.

Formación de embriones

La siguiente etapa de la embriogénesis somática consistió en subcultivar los callos en medio MS con una combinación de auxinas y citocininas. El necrosamiento fue mayor en los tratamientos con 2,4-D en comparación con los que tenían picloram, estos resultados coincidieron con los obtenidos en la palma de durazno (Steinmacher et al., 2007), *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022a) y *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022) donde se obtuvo un necrosamiento mayor en los medios con 2,4-D que los suplementados con picloram. Sin embargo, es necesario realizar más estudios con otros antioxidantes, diferentes a la L-cisteína y carbón activado en palma de soyamiche durante esta etapa de la embriogénesis somática.

El tratamiento más eficiente para la formación de embriones fue el que contenía 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ de kinetina (EMD1), es decir, la dosis más baja de reguladores de crecimiento. Se ha reportado que para la especie *Euterpe precatoria*,

las dosis bajas de reguladores de crecimiento como las auxinas o bien su eliminación, provoca una reducción en el gradiente polar de las auxinas, esto ocasiona la formación de embriones somáticos (Ferreira et al., 2022b)

Además, el uso combinado de auxinas y citocininas interrumpen los ciclos repetitivos de división celular, promoviendo así, la diferenciación y maduración celular, esto resulta en embriones somáticos más diferenciados (Figura 5 A y C) (Ferreira et al., 2022b). Sin embargo, los tratamientos con picloram tuvieron un nivel de diferenciación bajo, estos resultaron fueron diferentes a los obtenidos en palma datilera (Hassan et al., 2021) y palma de durazno (Steinmacher et al., 2007), mientras que en palma aceitera se requirió de una dosis alta de picloram (60 mg L^{-1}) (Scherwinski-Pereira et al., 2010).

También, las citocininas mejoran la embriogénesis somática durante la diferenciación embriogénica pero las respuestas son variables dependiendo del tipo y concentración (Ree & Guerra, 2015). Sin embargo, aunque el enfoque para la formación de embriones utilizando auxinas y citocininas combinadas es común, la función de estos reguladores de crecimiento en las distintas fases de la embriogénesis somática en palmas, aún no está claro (Ferreira et al., 2022a). En este sentido el 2,4-D a concentraciones bajas (0.1 mg L^{-1}) combinada con 0.5 mg L^{-1} de kinetina son las dosis adecuadas para la formación de embriones somáticos a partir de callo en palma de soyamiche.

Por otro lado, el proceso de embriogénesis somática en palma de soyamiche fue asincrónico (Figura 5 A), esto se ha reportado antes en otras especies de palmas: *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022), *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022A), *Acrocomia aculeata* (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014) y *Elaeis guineensis* (Scherwinski-Pereira et al., 2010). La asincronía se debe principalmente a los cambios de los nutrientes, durante los subcultivos de los embriones somáticos (Silva-Cardoso et al., 2022). Otra posible causa se debe a los medios semisólidos, porque en estos se forma un gradiente de sus componentes, lo que hace que la disponibilidad de nutrientes sea distinta (Pádua et al., 2018).

Maduración

Para la etapa de maduración, los embriones somáticos obtenidos en la etapa anterior fueron separados por nivel de diferenciación y colocados en medios de cultivo con diferentes dosis de 2,4-D. El mayor necrosamiento se obtuvo en el tratamiento con 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D (Mad1), esto coincide con lo reportado en *Acrocomia aculeata*, donde observaron que el necrosamiento disminuye conforme aumenta la concentración del regulador de crecimiento (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014) y es diferente a lo reportado en *Euterpe precatoria* donde se reporta un efecto fitotóxico del 2,4-D a concentraciones altas (Ferreira et al., 2022a). Estas diferencias en las respuestas posiblemente se deban a que las especies de palmas son distintas, ya que, las respuestas *in vitro* suelen ser específicas para cada especie de palma (Solangi et al., 2020).

Aunado a esto, Mad1 (0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D) fue el que presentó un menor nivel de diferenciación final, esto se debe a que algunos embriones somáticos formaron callo. Las auxinas como el 2,4-D influyen en la formación de callo al modificar la expresión genética, lo que promueve la desdiferenciación y rediferenciación (Ree & Guerra, 2015). Cabe destacar que se realizaron pruebas con diferentes dosis de 2,4-D y embriones cigóticos como explante durante la primera fase de la embriogénesis somática de palma de soyamiche (inducción de callo) pero no se logró la formación de callo (datos no mostrados), probablemente se deba a la diferencia en la madurez de los embriones, porque los tejidos más inmaduros tienen una capacidad callogénica mayor (Meira et al., 2020). Por otro lado, cuando se utilizó una dosis de 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Mad2) los embriones somáticos maduraron, estas diferentes respuestas sugieren que en palma de soyamiche son necesarias dosis mayores a 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D para la maduración de embriones somáticos.

Además, los embriones somáticos en un estado de diferenciación mayor, presentaron una coloración verde, esto coincide con los embriones somáticos de *Euterpe precatoria*, donde los autores atribuyen este color a componentes del medio como la sacarosa que promueve la maduración (Ferreira et al., 2022b). De igual forma, se observó la conversión a plántulas (Figura 3 E), pero sin formación de raíces, esto posiblemente se deba a que el carbón activado puede inhibir la

formación de raíces como ocurrió en embriones somático de *Elaeis guineensis*, los autores le atribuyen este efecto al carbón activado, porque puede absorber los reguladores de crecimiento, provocando la reducción o neutralización de sus actividades fisiológicas (Gomes et al., 2015).

También, el método y la duración en la fase de maduración, así como el tipo de embrión y los antecedentes genéticos de la planta madre, influyó en el desarrollo de raíces en embriones somáticos de *Pinus radiata* (Montalbán & Moncaleán, 2019). Por lo que, será necesario mejorar esta etapa o establecer una fase de enraizamiento para los embriones somáticos de palma de soyamiche.

Conclusión

Las condiciones *in vitro*, evaluadas en este estudio permitieron identificar los factores involucrados en cada una de las etapas de la embriogénesis somática en palma de soyamiche. También se sugieren más estudios en la etapa de maduración, para determinar condiciones más adecuadas, así como, dosis y tipos de antioxidantes que disminuyan el necrosamiento en palma de soyamiche.

LITERATURA CITADA

- Aguilera-Arango, G.A., Gómez-López, E.D., y González-Mejía, A. (2019). Callogénesis en cultivares híbridos de *Cocos nucifera* L. mediante cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras. *Biotechnología Vegetal*, 19(4), 277-284. <http://orcid.org/0000-0002-3942-4658>
- Alatorre-Cobos, J., Cano-Carmona, E., y Otero-Zaragoza, R. (2009). Catálogo florístico de las plantas medicinales de la selva baja subcaducifolia de Acapulco en México. *Boletín del Instituto de Estudios Giennenses*, (200), 231-288.
- Ali, H.M., Khan, T., Khan, M.A., & Ullah, N. (2022). The multipotent thidiazuron: A mechanistic overview of its roles in callogenesis and other plant cultures *in vitro*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(6), 2624-2640. <https://doi.org/10.1002/bab.2311>

- Almeida, R.F., Santos, I.R., Meira, F.S., Grynberg, P., Lopes, R., Da Cunha, R.N.V., & Mehta, A. (2019). Differential protein profiles in interspecific hybrids between *Elaeis oleifera* and *E. guineensis* with contrasting responses to somatic embryogenesis competence acquisition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (137), 11-21. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01545-8>
- Almeida, R.F., Meira, F.S., Gomes, H.T., Balzon, T.A., Bartos, P.M.C., De Oliveira Meira, R., Viera da Cunha, R.N., Lopes, R., Mehta, A., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2020). Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. *South African Journal of Botany*, 131, 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.026>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2006). Escoba *Cryosophila nana*. <https://enciclovida.mx/especies/156924-cryosophila-nana>
- Dar, S.A., Nawchoo, I.A., Tyub, S., & Kamili, A.N. (2021). Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royle ex Lindl. *Biotechnology Reports*, 32, Artículo e00688. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00688>
- Ferreira, J.C.B., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., De Oliveira Meira, R., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022a). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148(3), 667-686. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>
- Ferreira, J.C.B., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., Meira, R.O., Da Silva Costa, F.H., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022b). Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(5), 750-768. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>
- Ghosh, A., Igamberdiev, A.U., & Debnath, S.C. (2018). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. *Scientific Reports*, 8(1), Artículo 16978. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35233-6>

- Gomes, H.T., Bartos, P.M.C., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2015). Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51, 111-117. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9669-x>
- Gomes, H.T., Machado, L.G., Bartos, P.M.C., Balzon, T.A., Da Silva Costa, F.H., Azevedo, V.C.R., Cardoso, I.M.A.S., De Sousa, A.L.X., Inglis P.W., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2024). Somatic embryogenesis in oil palm from immature leaves with emphasis on leaf position, sequential callus re-collection, use of temporary immersion system, and assessment of genetic and epigenetic fidelity of the resulting clones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(2), 32. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02630-3>
- Hassan, M.M., Allam, M.A., Shams El Din, I.M., Malhat, M.H., & Taha, R.A. (2021). High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from date palm immature inflorescences using picloram. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00129-y>
- Haynes, J., & McLaughlin, J. (2000). Edible palms and their uses (pp. 4-6). Gainesville: University of Florida. <https://sfyl.ifas.ufl.edu/media/sfylifasufledu/miamidade/documents/landscape-s-amp-gardening/EdiblePalms.pdf>
- Ley-López, J.M., & Ávalos, G. (2017). Propagation of the palm flora in a lowland tropical rainforest in Costa Rica: fruit collection and germination patterns. *Tropical Conservation Science*, 10, Artículo 1940082917740703. <https://doi.org/10.1177/19400829177407>
- Liu, Y., Wei, C., Wang, H., Ma, X., Shen, H., & Yang, L. (2021). Indirect somatic embryogenesis and regeneration of *Fraxinus mandshurica* plants via callus tissue. *Journal of Forestry Research*, 32(4), 1613-1625. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01199-3>
- Luna-José, A.D., y Rendón-Aguilar, B. (2008). Recursos vegetales útiles en diez comunidades de la sierra madre del sur, Oaxaca, México. *Polibotánica*, 26, 193-242. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62102611>

- Luis, Z.G., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2014). An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (118), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0500-x>
- Meira, F.S., Luis, Z.G., Cardoso, I., Mariê, A., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2020). Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(3), 1-16. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180709>
- Montalbán, I.A., & Moncaleán, P. (2019). Rooting of *Pinus radiata* somatic embryos: factors involved in the success of the process. *Journal of Forestry Research*, 30(1), 65-71. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0618-5>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497
- Oliveira, L.B., De Mello, T., De Araujo, C.P., De Oliveira, J.P.B., Ferreira, A., Zanardo, T.É.C., Vieira, L.M., Otoni, W.O., Alexandre, R.S., & Carvalho, V.S. (2022). Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. *Scientia Horticulturae*, (299), Artículo 111051. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111051>
- Olivera-Triste, MT (2020). Identificación de biomoléculas de diferentes plantas con actividad hipoglucemiante [Tesis de maestría/ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/47589>
- Pádua, M.S., Santos, R.S., Labory, C.R.G., Stein, V.C., Mendonça, E.G., Alves, E., & Paiva, L.V. (2018). Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. *Protoplasma*, (255), 285-295. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1143-7>
- Panggabean, N.H., Basyuni, M., & Nurwahyuni, I. (2021, November). Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) micropropagation via somatic embryogenesis from female inflorescences explants. In *IOP Conference Series: Earth and*

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/912/1/012029>

- Sahraroo, A., Babalar, M., Mirjalili, M.H., Moghaddam, M.R.F., & Ebrahimi, S.N. (2014). *In-vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(4), Artículo 1447. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587336/>
- Sánchez-Calvo, L., y Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105
- Sander, N.L., Pulido-Silva, M.T., y Da Silva, C.J. (2023). Uso de las palmas en Latinoamérica. In *CRV*, (250). <https://doi.org/10.24824/978652514377.4>
- Scherwinski-Pereira, J.E., Da Guedes, R.S., Fermino, P.C.P., Silva, T.L., & Costa, F.H.S. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46, 378-385. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9279-6>
- Silva-Cardoso, I.M.D.A., Meira, F.S., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022). The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.] Becc. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44 (87). <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>
- Solangi, S.K., Qureshi, S.T., Khan, I.A., & Raza, S. (2016). Establishment of *in vitro* callus in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties influenced by different auxins. *African Journal of Biotechnology*, 15(29), 1541-1550. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14836>
- Solangi, N., Abul-Soad, A., Markhand, G., Jatoti, M., Jatt, T., & Mirani, A. (2020). Comparison among different auxins and cytokinins to induce date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic embryogenesis from floral buds. *Pakistan Journal Botany*, 52(4), 1243-1249. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-4\(30\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-4(30))

- Steinmacher, D.A., Clement, C.R., & Guerra, M.P. (2007). Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89, 15-22. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9207-6>
- Ree, J.F., & Guerra, M.P. (2015). Palm (*Arecaceae*) somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51, 589-602. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9722-9>
- Vegas-García, A., Molleda, P., Ortega, D., Paredes, E., Gualoto, W., Quintero, L., y Baque, W. (2019). Efecto del sorbitol, manitol y la sacarosa en la germinación *in vitro* de embriones de palma africana. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 36, 247-264. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/31935/3180>
- Yao, G., Zhang, Y.Q., Barrett, C., Xue, B., Bellot, S., Baker, W.J., & Ge, X.J. (2023). A plastid phylogenomic framework for the palm family (*Arecaceae*). *BMC biology*, 21(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01544-y>
- Yan, R., Sun, Y., & Sun, H. (2020). Current status and future perspectives of somatic embryogenesis in *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (143), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01916-0>
- Zhang, M., Wang, A., Qin, M., Qin, X., Yang, S., Su, S., Sun, Y., & Zhang, L. (2021). Direct and indirect somatic embryogenesis induction in *Camellia oleifera* Abel. *Frontiers in plant science*, 12, 644389. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.644389>
- Zein El Din, A.F., Darwesh, R.S., Ibrahim, M.F., Salama, G.M., Shams El-Din, I.M., Abdelaal, W.B., Ali, G.A., Elsayed, M.S., Ismail, I.A., Dessoky, E.S., & Abdellatif, Y.M. (2022). Antioxidants Application Enhances Regeneration and Conversion of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Somatic Embryos. *Plants*, 11(15), 2023. <https://doi.org/10.3390/plants11152023>

**VII. Descripción anatómica e histológica de embriones
somáticos obtenidos *in vitro* de palma de soyamiche
[*Cryosophila nana* (Kunth) Blume ex Salomon]**

RESUMEN

La palma de soyamiche es una especie endémica que se encuentra en peligro de extinción. Esta especie es utilizada principalmente por comunidades rurales, debido a su importancia económica, cultural y medicinal. Además de esto, los taxones de la familia *Arecaceae* presentan problemas de propagación convencional. Por eso se buscan alternativas para su propagación como lo es la embriogénesis somática (ES) porque tiene mayor efectividad en la propagación de palmeras. Sin embargo, hasta el día de hoy no existen estudios sobre ES en palma de soyamiche, razón por la cual son necesarios análisis detallados de este proceso que se apoyen en herramientas histológicas como fue el caso de este estudio. Para llevarlo a cabo se utilizaron las tinciones de safranina-verde rápido, azul de toluidina y microscopía de fluorescencia. Los callos embriogénicos estaban compuestos por tres zonas: meristemática, intermedia y embriogénica, además, se observaron embriones tipo globular y torpedo en la etapa de inducción de callo probablemente de origen directo. También, se observaron embriones globulares con y sin suspensor esto sugiere un origen unicelular y multicelular respectivamente. Por otro lado, la bipolaridad del embrión se observó en la fase torpedo, así como embriones somáticos con variación somaclonal las cuales son causadas principalmente por los reguladores de crecimiento. Se sugiere utilizar un filtro rojo para fluorescencia o utilizar otro tipo de fluoróforo que permita distinguir tejidos jóvenes. Sin embargo, la descripción anatómica permitió identificar cada una de las fases de la embriogénesis somática en palma de soyamiche corroborando así dicho proceso.

Palabras claves: Callo embriogénico, embriones somáticos, células meristemáticas, células embriogénicas, fluorescencia.

Tesis de maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.
Autora: Ma. Guadalupe Mayo Mayo
Director de Tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O

ABSTRAC

The soyamiche palm is an endemic species that is in danger of extinction. This species is mainly used by rural communities, due to its economic, cultural and medicinal importance. In addition to this, the taxa of the *Arecaceae* family present conventional propagation problems. That is why alternatives are sought for its propagation, such as somatic embryogenesis (ES) because it is more effective in the propagation of palm trees. However, to date there are no studies on ES in soyamiche palm, which is why detailed analyzes of this process are necessary that are supported by histological tools, as was the case in this study. To carry it out, safranin-fast green, toluidine blue and fluorescence microscopy stains were used. The embryogenic callus was composed of three zones: meristematic, intermediate and embryogenic. In addition, globular and torpedo-type embryos were observed in the callus induction stage, probably of direct origin. Also, globular embryos were observed with and without a suspensor, suggesting a unicellular and multicellular origin respectively. On the other hand, embryo bipolarity was observed in the torpedo phase, as well as somatic embryos with mutations which are mainly caused by growth regulators. It is suggested to use a red filter for fluorescence or use another type of fluorophore that allows young tissues to be distinguished. However, the anatomical description allowed us to identify each of the phases of somatic embryogenesis in soyamiche palm, thus corroborating said process.

Keywords: Embryogenic callus, somatic embryos, meristematic cells, embryogenic cells, fluorescence.

Thesis in Agricultural Biotechnology Sciences, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Ma. Guadalupe Mayo Mayo

Advisor: Dr. José Luis Rodríguez de la O

INTRODUCCIÓN

La palma de soyamiche es una especie que pertenece a la familia *Arecaceae* y es endémica de México (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006). Esta palma es usada principalmente en las comunidades rurales de los estados de Oaxaca y Guerrero como material para construcción de viviendas, en la fabricación de artesanías, consumo, uso medicinal y ornato (Luna-José & Rendón-Aguilar, 2008; Alatorre-Cobo et al., 2009; Olivera-Triste, 2020).

Sin embargo, debido a su sobreexplotación, destrucción de su hábitat y los problemas de propagación convencional que presentan varios miembros de la familia *Arecaceae* han hecho que la palma de soyamiche se encuentre amenazada (Ley-López & Ávalos, 2017; Vegas-García et al., 2019). No obstante, se han utilizado técnicas de cultivo *in vitro* como la embriogénesis somática que permiten multiplicar, conservar y rescatar especies en peligro de extinción como lo es la palma de soyamiche (Silva-Cardoso et al., 2022).

El proceso de embriogénesis somática consiste en la desdiferenciación de tejido somático y la posterior obtención de capacidad embriogénica de este tejido (Yan et al., 2020). Para esto se requiere de una reprogramación de las células que mayormente es mediada por reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas debido al papel que tienen en el crecimiento y desarrollo vegetal (Hassan et al., 2021).

En palma de soyamiche no existen estudios sobre embriogénesis somática a pesar de que con esta técnica se puede rescatar y conservar a la especie, por lo que se requiere de estudios muy detallados para comprender cada uno de los aspectos del proceso. Como pueden ser los análisis histológicos de los embriones somáticos, porque con ellos no solo se puede observar y conocer el desarrollo de las células y tejidos durante cada una de las fases de la embriogénesis somática *in vitro* de palmas cuya ontogénesis es poco conocida, sino que además es posible identificar marcadores bioquímicos de tejidos con potencial embriogénico (Meira et al., 2019).

Se han realizado estudios en diferentes especies de palmas ya sean de importancia comercial como *Cocus nucifera* L. (Welewanni et al., 2020), *Elaeis guineensis* Jacq (Vilela et al., 2019) y *Phoenix dactylifera* L. (Al-Khayri et al., 2017) o en especies con potencial económico como *Acrocomia aculeata* (Meira et al., 2019), *Syagrus oleracea* (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020) y *Euterpe precatoria* (Mart.) (Ferreira et al., 2022a), con la finalidad de describir cada una de las etapas de la embriogénesis somática y entender la embriogénesis cigótica por la similitud entre ambos procesos (Winkelmann, 2016). Para comprender mejor el proceso de embriogénesis somática en palma de soyamiche el objetivo de este estudio fue realizar la descripción anatómica de cada una de las estructuras obtenidas en las etapas del proceso embriogénico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y cultivo *in vitro*

Los callos se obtuvieron a partir de embriones cigóticos extraídos de semillas maduras de palma de soyamiche. Las semillas se adquirieron en la comunidad de “El mezon” ubicada en el municipio de Ayutla de Los Libres, Guerrero (latitud 16°50'44"N y longitud 99°3'29"W). Luego el material vegetal fue trasladado al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en la Universidad Autónoma Chapingo.

Después, las semillas se lavaron con agua, jabón y Tween 20, para luego ser desinfectadas en condiciones de cámara de flujo laminar mediante inmersión en alcohol etílico al 70 % (v/v) durante tres minutos, hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) durante 15 minutos, seguido de un lavado triple en agua destilada estéril. Enseguida, los embriones cigóticos fueron extraídos con una prensa de acero inoxidable manual y estéril, los embriones fueron sembrados en medio basal Murashige y Skoog (1962) (Sigma, St. Louis, MO) que fue suplementado con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina (ICN Pharmaceuticals, Plainview, N.Y), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol (Sigma, St. Louis, MO), 100 mg L⁻¹ de L-cisteína (Sigma, St. Louis, MO), 50 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 5.0 mg L⁻¹ de tidiazuron, para inducir la formación de callo. Los explantes fueron incubados en oscuridad a 25 °C.

Durante la fase de formación de embriones al medio se le añadieron además de los suplementos anteriores (excepto por el tidiazuron): 400 mg L⁻¹ de glutamina, 100 mg L⁻¹ de arginina, 100 mg L⁻¹ asparagina 10 g L⁻¹ de caseína hidrolizada, 1 g L⁻¹ de carbón activado, kinetina y 2,4-D. Todos los medios fueron distribuidos en frascos de vidrio tipo Gerber con 20 ml de medio por recipiente, además, fueron colocados en un cuarto de cultivo a 25 °C con una intensidad luminosa de 12.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad.

Preparaciones histológicas

Para el análisis histológico se tomaron muestras del material *in vitro*, estas fueron fijadas utilizando formaldehído, alcohol y ácido acético (FAA), posteriormente la deshidratación se realizó mediante inmersión en alcoholes graduales, para esto se utilizó el procesador automático de tejidos Histokiner Leica TP 1020 de 12 estaciones, el material se dejó reposar durante 6 horas por estación. Posteriormente se realizó una inclusión en parafina y se realizaron cortes de 12 μm con un microtomo manual rotatorio (Leica®, RM212RT)

Tinción con azul de toluidina

Las muestras del material *in vitro* se tiñeron mediante inmersión en xileno durante tres minutos cada una, seguido alcohol al 100, 96, 70 y 50 % (v/v) durante tres minutos cada una, posteriormente se tiñeron por inmersión durante 15 minutos en azul de toluidina, seguido de un enjuague con alcohol etílico al 96 % (v/v) durante diez segundos, para después transferirse a alcohol etílico al 96 % (v/v) durante minuto y medio, seguido de una serie de inmersiones en alcohol al 100 % durante 16 minutos y xileno durante 12 minutos, para después ser fijada con resina líquida. Se dejaron secar durante 10 días y se tomaron fotografías en campo claro (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), a las fotografías se les ajustó el brillo y contraste con el software Zen lite 2012.

Tinción safranina-verde rápido y microscopía de fluorescencia

Las muestras del material *in vitro* se tiñeron mediante inmersión en xileno durante tres minutos cada una, seguido alcoholes graduales al 100, 96, 70 y 50 % (v/v)

durante tres minutos cada una, posteriormente se tiñeron por inmersión durante 45 minutos en safranina, seguido de un de enjuague en agua destilada durante 10 segundos y se transfieren en alcohol etílico al 50, 70 y 96 % (v/v) por tres minutos, dos minutos y dos minutos respectivamente.

Luego se realizó una segunda tinción con verde rápido durante un minuto y se enjuagó con alcohol absoluto, seguido de una serie de inmersiones en alcohol al 100 % durante 16 minutos y xileno durante 12 minutos, para después ser fijada con resina líquida. Por último, se dejaron secar durante 10 días. Y se visualizaron utilizando los filtros rojo y verde del microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, modelo Axio Scope A1 (Oberkochen, Alemania). Posteriormente las micrografías fueron procesadas con el software Zen lite 2012, ajustando solo el contraste y el brillo de las mismas.

RESULTADOS

Descripción anatómica e histológica de callo embriogénico

Para comprender mejor la embriogénesis somática de la palma de soyamiche se realizaron análisis histológicos de cada una de las estructuras obtenidas durante el proceso de embriogénesis somática *in vitro*. En el medio de cultivo para inducir la formación de callo a partir de embriones cigóticos de palma de soyamiche se obtuvieron callos esponjosos de colores entre blanco y beige, después de 70 días de cultivo.

En este tipo de callo se comenzó a formar tejido compacto translúcido y embriones tipo torpedo (Figura 6 A). En la figura 6 B se observó un callo embriogénico formado por tres zonas: una zona central meristemática, formada por células meristemáticas, es decir, con núcleos grandes, sin vacuolas o de tamaño pequeño, citoplasma denso y paredes celulares delgadas; la zona intermedia está formada por células con características parenquimatosas: con núcleos pequeños que se encuentran comprimidos hacia la pared celular por vacuolas grandes.

Y en la periferia del callo se distingue una zona embriogénica formada por células en división con núcleos grandes, vacuolas fragmentadas, citoplasma denso y

espacios intracelulares visibles. De igual forma en la periferia del callo se visualizaron proembriones multicelulares, estos están formados por una célula apical y un suspensor el cual indica el origen unicelular de los embriones somáticos (Figura 6 C).

También se observó que algunos callos comenzaron a formar estructuras embriogénicas más avanzadas como en estado globular (no mostrado) y torpedo, este último, caracterizado por ser una estructura alargada con protodermis, procambium y un meristemo de raíz (Figura 6 D). Además, en la región distal del proembrión tipo torpedo se observó la formación de una estructura esférica (punta de flecha, Figura 6 D), conformada por células en división con núcleos grandes, nucleolos visibles y vacuolas grandes, esta estructura es probablemente un embrión somático secundario.

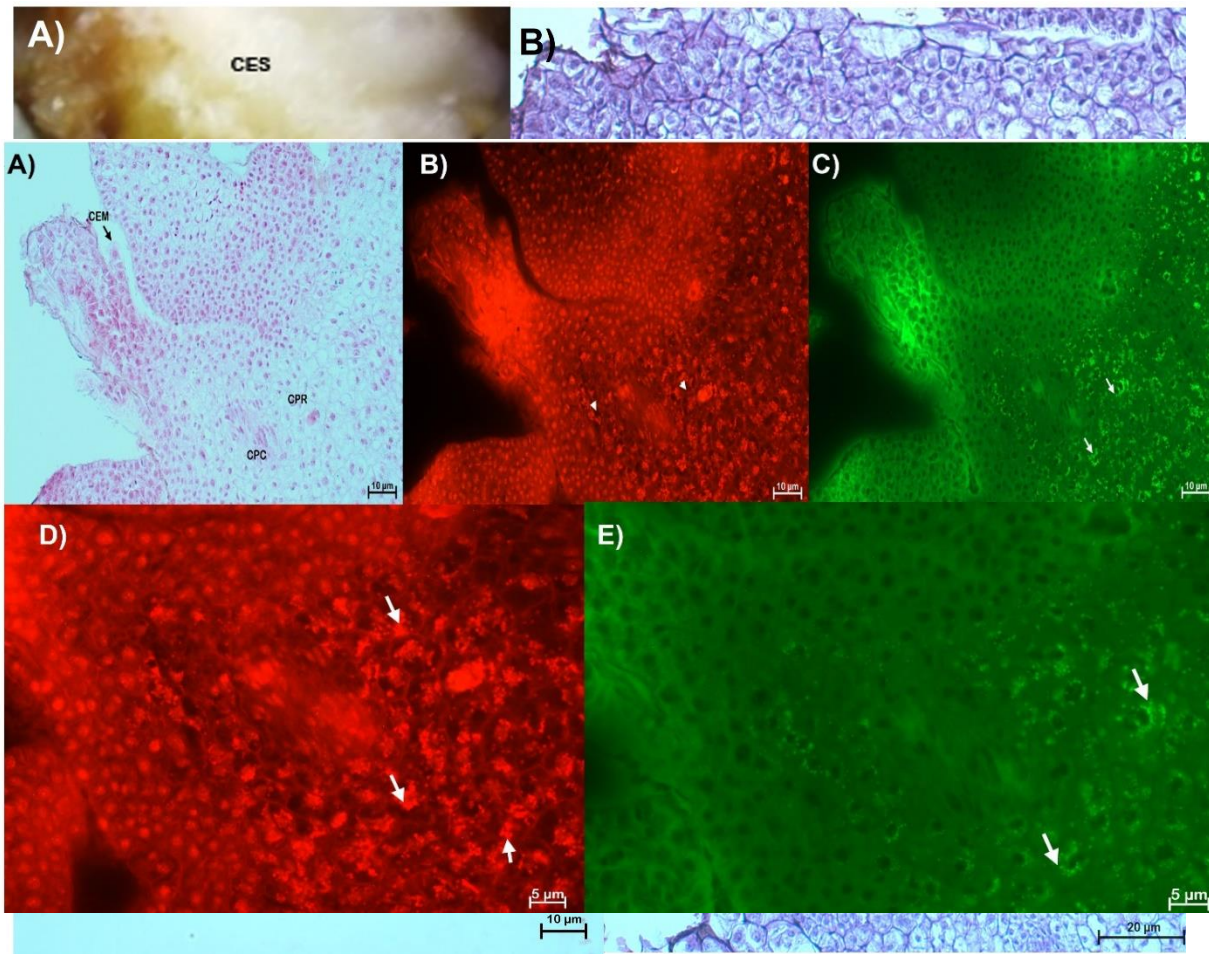


Figura 6. Callo embriogénico de la palma de soyamiche obtenido a partir de embriones cigóticos. A) Callo embriogénico esponjoso que después de 70 días en medio de inducción de callo. B) Anatomía del callo embriogénico, formado por tres zonas diferentes: zona central meristemática, zona intermedia y zona embriogénica. C) Proembriones con múltiples divisiones ubicados en la periferia del callo teñidos con safranina-verde-rápido. D) Estructuras embriogénicas tipo torpedo desarrolladas en medio para callo. CAP (células apicales), CE (callo embriogénico), CES (callo esponjoso) MR (meristemo de raíz), PC (procambium), PD (protodermis), PT (proembrión torpedo), SP (suspensor), ZCM (zona central meristemática), ZEM (zona embriogénica), ZI (zona intermedia).

En la figura 7 A, se observaron estructuras embriogénicas formadas por células con núcleos grandes, nucleolos visibles, citoplasma denso y sin o muy poca presencia de vacuolas, además se identificaron tejidos más desarrollados que pertenecen al explante, en el cual se observaron células parenquimatosas, que tenían vacuolas grandes, núcleos pequeños y amiloplastos, mientras que las células procambiales, son forma alargadas con núcleos grandes. Con el uso de la fluorescencia se pudieron distinguir el tejido de la estructura embriogénica y del explante porque se observó fluorescencia en este último (Figura 7 B y C). También fue evidente la fluorescencia de los amiloplastos (flechas) del parénquima en los filtros rojo y verde, además, en el filtro rojo las vacuolas de las células parenquimatosas se distinguen como una zona negra dentro de la célula (Figura 7 D y E).

Descripción anatómica e histológica de embriones globulares

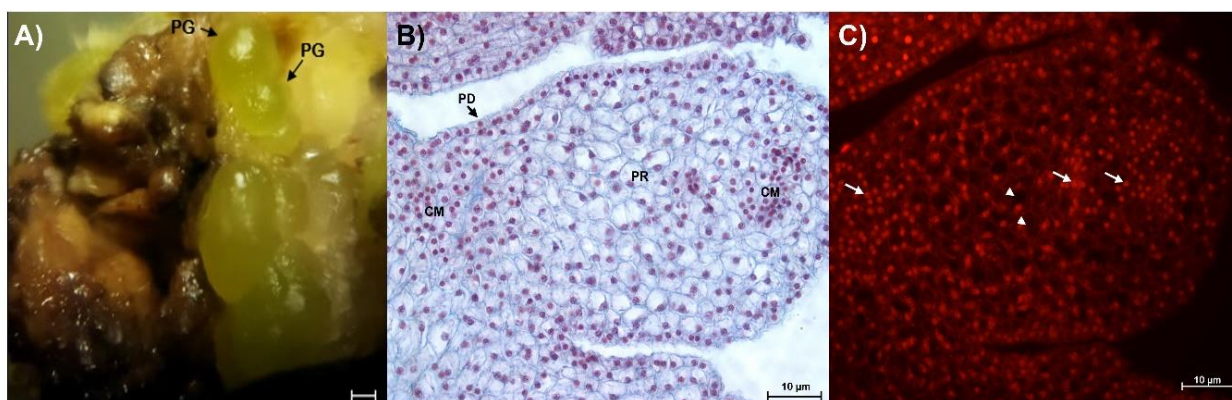


Figura 8. Proembriones o estructuras globulares de la palma de soyamiche obtenidas en medio para formar embriones. A) Desarrollo de proembriones después de 70 días de estar en el medio de cultivo para formar embriones. B) Anatomía del embrión globular teñido con safranina-verde rápido sin suspensor. C) Estructura del proembrión observada con fluorescencia. CM (células meristemáticas), PC (procambium), PD (protodermis), PG (embrión globular), PR (parénquima).

Cuando los callos se subcultivaron en medio para formar embriones se observaron estructuras proembriogénicas o globulares (Figura 8 A). Los embriones somáticos de tipo globular tienen una protodermis definida (Figura 8 B). Además, se observaron dos zonas de células meristemáticas en las regiones proximal y distal de la estructura globular y células de parénquima con paredes teñidas de verde. También, se observó células con grado variables de vacuolización, dichas vacuolas se visualizaron como espacios negros al usar microscopia de fluorescencia (Figura 8 C, punta de flechas), mientras que los núcleos de todas las células fueron los únicos que presentaron fluorescencia (Figura 8 C, flechas) debido a que estaban teñidos intensamente con safranina.

En la figura 9 A se observa un embrión globular con suspensor evidente, además de una protodermis caracterizada por células con núcleos grandes y centralizados que forman una capa uniseriada (Figura 9 B). Así mismo, se observó una zona con células meristemáticas en la región proximal (Figura 9 C). Otra de las características que presentan las células de los proembriones de la palma de soyamiche es el inicio de la formación de células de procambium que se caracterizan por células alargadas con núcleos teñidos intensamente con azul de toluidina (Figura 9 D).

Por otro lado, con la fluorescencia se observó que sólo los núcleos de todos los tipos de células emitieron fluorescencia intensa (Figura 9 E y F).

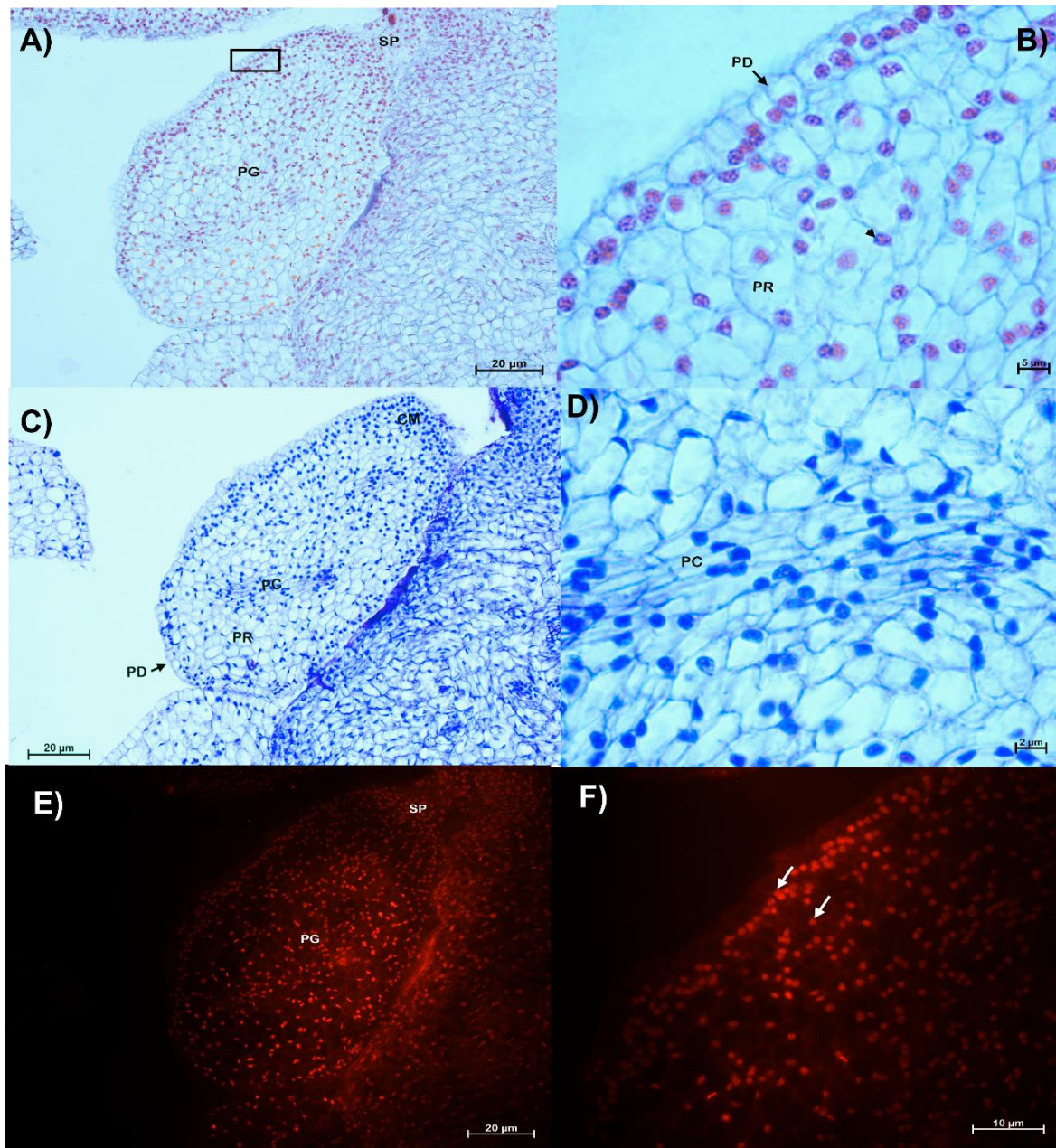


Figura 9. Proembriones o estructuras globulares de la palma de soyamiche con suspensor. A) Embrión somático en la superficie del callo y conectados por el suspensor, teñido con safranina-verde rápido. B) Células de la protodermis y del procambium teñidos con safranina-verde rápido. C) Embrión somático en la superficie del callo, teñido con azul de toluidina. D) Células del procambium teñidos con azul de toluidina. E) y F) Anatomía del proembrión observada con fluorescencia, se observan núcleos fluorescentes (flechas). CM (células meristemáticas), PC

(procambium), PD (protodermis), PG (embrión globular), PR (parénquima), SP (suspensor).

Descripción anatómica e histológica de embriones tipo torpedo

La siguiente etapa de la embriogénesis somática es la etapa torpedo. En la figura 10 A se muestra la anatomía de un embrión torpedo sin conexión vascular al tejido materno. En polo proximal se encuentra el meristemo de raíz, formado por células con características meristemáticas como: núcleos y citoplasma abundante, núcleos grandes teñidos de un azul intenso y nucleolos visibles.

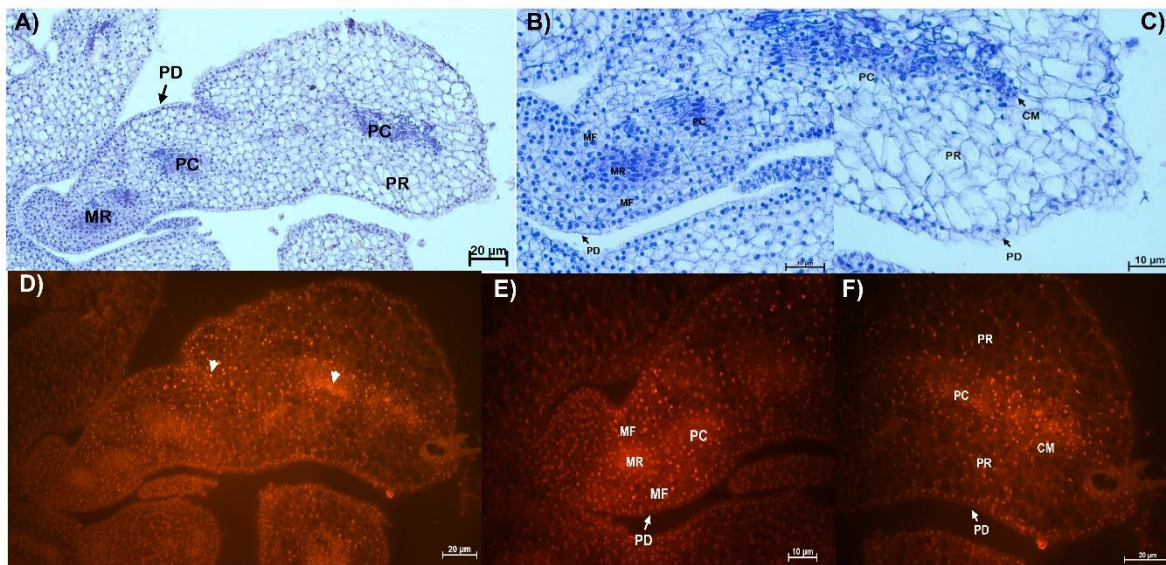


Figura 10. Embrión somático tipo torpedo de palma de soyamiche. A) Anatomía del embrión somático en fase torpedo con protodermis definida, un meristemo de raíz en la región proximal, células meristemáticas en la región distal y un procambium. B) Región proximal del embrión somático, se observan tres tipos de meristemos: de raíz, fundamental y procambium. C) Región distal del embrión somático, formada por células meristemáticas, procambium y tejido parenquimático. D), E) y F) embrión somático visto con fluorescencia, fluorescencia intensa en los núcleos de las células (puntas de flechas). CM (células meristemáticas), MF (meristemo fundamental), MR (meristemo de raíz), PC (procambium), PD (protodermis), PR (parénquima).

En las partes laterales al meristema de raíz se observaron células del meristemo fundamental con diferentes formas, vacuolas visibles y núcleos centralizados. De igual forma se visualizó un procambium compuesto de células alargadas, con núcleos grandes y nucleolos visibles (Figura 10 B). Mientras que en el polo distal hubo presencia de células meristemáticas y de parénquima (Figura 10 C). Las regiones meristemáticas del embrión eran más evidentes con el uso de la microscopía de fluorescencia porque sus núcleos emitían fluorescencia intensa (Figura 10 D, E, F).

En el embrión en fase torpedo se observó la formación de un eje primario en la región proximal del embrión (Figura 11 A), dicho eje se compone por un meristemo de raíz, meristemo fundamental y procambium, además fue posible la visualización de células más desarrolladas caracterizadas por una pared celular gruesa compuesta principalmente de celulosa (Figura 11 D, flechas). También, fue evidente la formación de un embrión somático secundario, el cual se observó en la parte lateral del embrión tipo torpedo (Figura 11 A). Además, en la región distal se muestran células embriogénicas cortadas longitudinalmente. También, en dicha región se visualizaron células parenquimatosas, protodérmicas, procambiales, específicamente elementos del vaso (Figura 11 B y C).

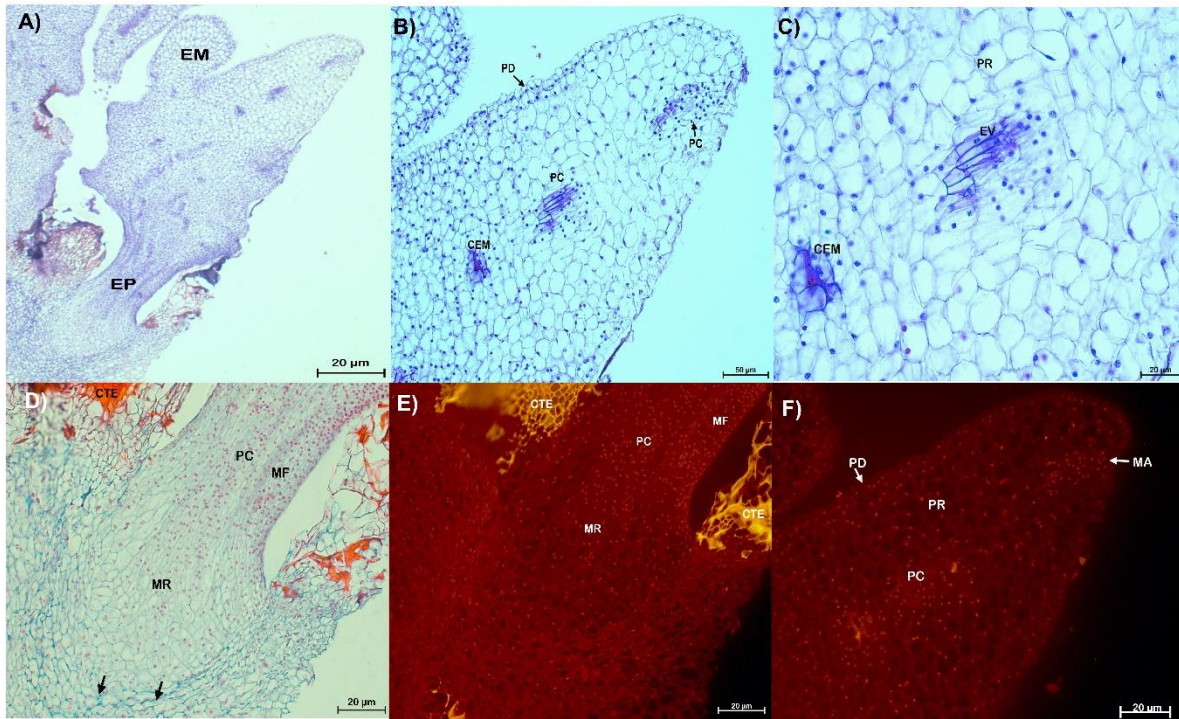


Figura 11. Embrión somático en estado torpedo con evidencia de embriogénesis secundaria. A) Anatomía del embrión en fase torpedo teñido con azul de toluidina con un embrión somático producto de la embriogénesis secundaria y un eje primario en la región proximal. B) Anatomía de la región distal del embrión somático con protodermis evidente. C) Células del parénquima, procambium de la región distal del embrión, se observan células embriogénicas cortadas longitudinalmente. D) Región proximal del embrión somático teñido con safranina-verde rápido, se observa un meristemo de raíz, procambium y meristemo fundamental. E) y F) Anatomía de las regiones proximal y distal de embrión observados con microscopía de fluorescencia. CEM (células embriogénicas), CTE (células con cutina), EM (embrión somático), EP (eje primario), EV (elementos del vaso), MA (meristemo apical), MF (meristemo fundamental), MR (meristemo de raíz), PC (procambium), PD (protodermis), PR (parénquima).

Mientras que, los núcleos de estos tipos de células tenían fluorescencia y gracias a esta técnica se visualizó la cutícula de algunas células que pertenecen al tejido materno, cuya fluorescencia fue de color amarillo intenso (Figura 11 E y F).

Descripción anatómica e histológica de embriones somáticos con variaciones somaclonales.

Una vez obtenidos los embriones somáticos estos fueron subcultivados en medio para que maduraran, sin embargo, hubo algunos con malformaciones, como se muestra en la figura 12 A donde se observó un embrión con dos primordios foliares en la región distal, un meristemo de brote y un meristemo de raíz en la región proximal. El meristemo de brote y los primordios foliares se caracterizaron por células meristemáticas (punta de flecha) con núcleos teñidos intensamente con safranina y cuya fluorescencia es intensa (Figura 12 B y C). De igual forma, en uno de los primordios se observó la presencia de células alargadas con núcleos grandes, es decir, células procambiales (Figura 12 B). También, se observaron células de la protodermis, cuyas características son: células con núcleos grandes, centralizados y teñidos intensamente con safranina. Mientras que las células del parénquima son grandes con núcleos pequeños y vacuolas grandes (Figura 12 B y C).

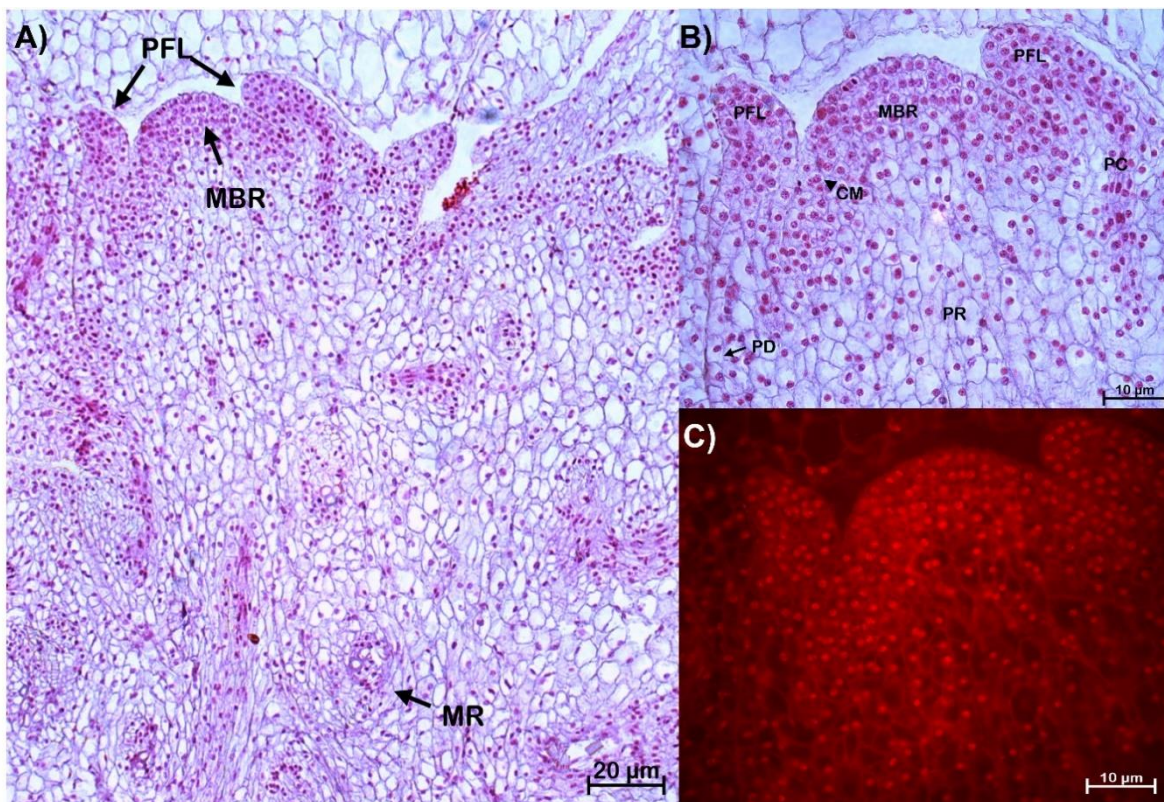


Figura 12. Embrión somático mutante con dos primordios foliares. A) Embrión somático bipolar teñido con safranina-verde rápido. B) y C) Región distal del embrión somático formado por un meristema de brotes y dos primordios foliares vista en campo claro y con fluorescencia. CM (células meristemáticas), MBR (meristemo de brote), MR (meristemo de raíz), PC (procambium), PD (protodermis), PFL (primordios foliares), PR (parénquima).

DISCUSIÓN

Descripción anatómica e histológica de callos embriogénicos

Las características físicas de los callos embriogénicos de la palma de soyamiche eran similares a las reportadas por Silva-Cardoso et al. (2022) y Ferreira et al. (2022a), ellos también, observaron células embriogénicas en la periferia del callo esponjoso al igual que en los callos de la palma de soyamiche, por lo que este tipo de callo se considera embriogénico para esta especie. Además, las tres zonas (central meristemática, intermedia y embriogénica) encontradas en los callos de palma de soyamiche coincidieron con los callos embriogénicos obtenidos de explantes foliares y embriones cigóticos de la palma *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022b; Ferreira et al., 2022a) y de la especie *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022) con inflorescencias como explante. Además, se sabe que la zona central meristemática está relacionada con el crecimiento del callo (Ferreira et al., 2022a).

Los embriones encontrados en la periferia del callo sugieren un origen unicelular, debido a la presencia de un suspensor, además junto con la célula apical es evidencia de una división asimétrica de una célula (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014). También se obtuvieron embriones en etapa torpedo, la formación de estructuras embriogénicas durante la etapa de inducción de callo ha sido reportada antes en especies como *Euterpe precatoria* y *Syagrus oleracea* (Ferreira et al., 2022a; Silva-Cardoso et al., 2022), y de acuerdo con la hipótesis de Silva-Cardoso et al. (2022) estas estructuras son embriones somáticos formados directamente y de origen pluricelular.

En palma de soyamiche se encontró evidencia de posible inicio de embriogénesis secundaria, dicho proceso se ha reportado en otras especies de palmeras como: *Syagrus oleracea* (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2011), *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022b). En especies como *Bactris gasipaes* se ha buscado inducir la embriogénesis secundaria porque, el potencial embriogénico no se pierde después de varios subcultivos y se puede obtener un número mayor de embriones somáticos (Steinmacher et al., 2011), por lo que el tratamiento utilizado en la inducción de callo en palma de soyamiche, puede no solo ayudar a acelerar el proceso en la diferenciación celular de los callos embriogénicos, sino que, es posible aumentar los rendimientos en la obtención de embriones somáticos, sin embargo se necesitan de más estudios enfocados en el procesos de la embriogénesis secundaria en palma de soyamiche.

Con el uso de la fluorescencia fue posible visualizar los amiloplastos en las células del parénquima este tipo de plastidios se encuentran principalmente en las células de parénquima de reserva, se ha reportado que el inicio de la formación de callo se da a partir de células parenquimáticas y que las reservas de carbohidratos en palmas durante la embriogénesis somática se relacionan con la diferenciación de células embriogénicas (Meira et al., 2019). Además, estas reservas de almidón sirven como fuente de energía para la intensa actividad celular del proceso embriogénico (Ferreira et al., 2022b).

Descripción anatómica e histológica de embriones globulares

Los embriones somáticos pueden tener dos posibles orígenes: unicelular y multicelular (Silva-Cardoso et al., 2022; Ferreira et al., 2022a). El origen unicelular se confirma por la presencia de un suspensor, mientras que los embriones multicelulares no cuentan con uno (Ferreira et al., 2022a). En las figuras 8 y 9 A se muestra que a partir de los callos obtenidos a partir de embriones cigóticos de la palma de soyamiche se formaron los dos tipos de embriones somáticos. De acuerdo con Luis y Scherwinski-Pereira (2014) los embriones somáticos de origen multicelular se forman a partir de tejido interno de callos nodulares, mientras que los

embriones unicelulares se forman a partir de tejido externo en la palma *Acrocomia aculeata*.

Por otro lado, la protodermis es un tipo de meristemo que dará origen a la epidermis, y es el primer tejido que se identificó histológicamente en los embriones globulares de especies como: *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022b), *Acrocomia aculeata* (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014), *Syagrus oleracea* (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020) y *Elaeis guineensis* (Vilela et al., 2019), en esta última también se observó la formación de procambium al igual que en los embriones con suspensor de la palma de soyamiche. También, las células meristemáticas ubicadas en las regiones proximales de los embriones globulares son indicativos de formación de meristemas (Silva-Cardoso et al., 2022) tal y como se muestra en los embriones globulares de la especie analizada.

Con el uso de la microscopía de fluorescencia se observaron que los embriones somáticos de palma de soyamiche presentaron fluorescencia roja en sus núcleos al utilizar la safranina como fluoróforo, esto se debe que el espectro de excitación del filtro rojo es 530-555 nm y de acuerdo con Guo et al. (1998) la safranina tiene un espectro de excitación máximo de 533 nm en presencia de ácidos nucleicos y un espectro de emisión máxima de 578 nm. Por otro lado, con el filtro verde (espectro de excitación = 450-490 nm) no hubo fluorescencia.

Esto coincide con lo observado en células de lino con paredes lignificadas bajo excitación de 488 nm, se determinó que su espectro de emisión depende de la cantidad de lignina de las paredes, cuyos valores oscilaron entre 570–600 nm, que corresponde a la región roja y naranja, también observaron que la región verde permaneció sin fluorescencia (Baldacci-Cresp et al., 2020). Basado en lo anterior se recomienda que para los embriones somáticos se utilice el filtro rojo, porque con el verde no se distinguirá otros componentes como es el caso de las paredes ya que los tejidos jóvenes no presentan lignina.

Descripción anatómica e histológica de embriones tipo torpedo

La bipolaridad del embrión se estableció en la etapa torpedo, esto también se reportó en embriones somáticos de la palma *Acrocomia aculeata* (Luis & Scherwinski-Pereira, 2014). La visualización de tejidos como la protodermis, meristemo fundamental, meristemo de raíz, procambium, además de la falta de conexión con el callo de origen son características de los embriones tipo torpedo de otras especies de palmas como: *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022b), *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2022), *Elaeis guineensis* (Vilela et al., 2019) y *Euterpe oleracea* (De Olivera Freitas et al., 2016), con lo anterior fue posible identificar embriones somáticos en estado torpedo en palma de soyamiche.

De igual forma, en la etapa torpedo fue posible visualizar embriones secundarios, se ha reportado que la embriogénesis secundaria puede ocurrir en etapas tempranas de la embriogénesis primaria (Steinmacher et al., 2011). Por ejemplo, en *Syagrus oleracea* (De Araújo Silva-Cardoso et al., 2020), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2011) y *Euterpe oleracea* (De Olivera Freitas et al., 2016), la formación de embriones secundarios ocurrió en embriones globulares, mientras que en *Euterpe precatoria* ocurrió en la etapa de maduración (Ferreira et al., 2022a). Sin embargo, es en las primeras etapas de desarrollo es cuando se tiene una mayor capacidad embriogénica porque hay una expresión mayor de factores de transcripción como *SERK* y *LEC*, los cuales se relacionan con la embriogénesis somática (Steinmacher et al., 2011).

Por otro lado, con la microscopia de fluorescencia se identificó la cutícula de las células correspondientes al tejido materno, estas presentaron un color amarillo intenso, dicho color fue reportado por De Micco y Aronne (2007) en células epidérmicas de *Rhamnus alaternus* L. teñidas con safranina. Además, se observó que el embrión somático tipo torpedo estaba se formó un eje primario, sin embargo, el desarrollo de esta estructura no ha sido reportada antes, pero basado en la ubicación del meristemo de raíz se plantea la hipótesis de que posiblemente se deba a un desarrollo anormal del hipocótilo.

Descripción anatómica e histológica de embriones somáticos con variaciones somaclonales.

De acuerdo con Evans (1995) la palma de soyamiche es una especie monocotiledónea. En dicha especie se encontraron embriones anormales porque se observó que estos embriones presentaban dos cotiledones (Figura 12 A y B), la aparición de este tipo de embriones se ha reportado en otras especies como *Butia odorata* (Fior et al., 2018) y *Euterpe oleracea* (De Olivera Freitas et al., 2016), *Euterpe precatoria* (Ferreira et al., 2022a), pero, los embriones somáticos anormales obtenidos en estos estudios estaban fusionados al tejido de origen o fusionados entre ellos. Sin embargo, en el caso de los obtenidos de palma de soyamiche, estos tenían dos primordios, de acuerdo con García et al. (2019) las anomalías más comunes en embriones somáticos son la fusión de dos o más embriones, falta de meristemas del ápice o radícula y cotiledones múltiples como en la especie analizada. En *Paeonia* se reportó la obtención de embriones con cotiledones múltiples, un solo cotiledón y cotiledón tubular, dichas anomalías fueron producto de divisiones celulares anormales causadas por concentraciones altas de reguladores de crecimiento que se añaden a los medios de cultivos, sin embargo, estos embriones no germinaron (Du et al., 2020).

CONCLUSIÓN

Las características anatómicas de las estructuras encontradas durante el proceso de embriogénesis somática permitieron identificarlos como embriones somáticos, con esto se corroboró dicho proceso. Además, se identificaron embriones de origen directo, multicelular, unicelular y embriones con mutaciones.

LITERATURA CITADA

Baldacci-Cresp, F., Spriet, C., Twyffels, L., Blervacq, A.S., Neutelings, G., Baucher, M., & Hawkins, S. (2020). A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *The Plant Journal*, 102(5), 1074-1089. <https://doi.org/10.1111/tpj.14675>

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2006). Escoba *Cryosophila nana*. <https://enciclovida.mx/especies/156924-cryosophila-nana>
- De Araújo Silva-Cardoso, I.M., Meira, F.S., Gomes, A.C., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2020). Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. *Physiologia plantarum*, 168(4), 845-875. <https://doi.org/10.1111/ppl.13026>
- De Micco, V., & Aronne, G. (2007). Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. *Biotechnic & Histochemistry*, 82(4-5), 209-216. <https://doi.org/10.1080/10520290701713981>
- De Olivera Freitas, E., Monteiro, T.R., Nogueira, G.F., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2016). Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. *Scientia Horticulturae*, (212), 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>
- Du, Y., Cheng, F., & Zhong, Y. (2020). Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia* sect. Moutan). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (141), 557-570. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01815-4>
- Ferreira, J.C.B., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., De Oliveira Meira, R., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022a). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148(3), 667-686. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>
- Ferreira, J.C.B., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., Meira, R.O., Da Silva Costa, F.H., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022b). Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(5), 750-768. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>
- Fior, C., Costa-Calil, A., Dutra de Souza, P., y Schwarz, S. (2018). Impacto de las concentraciones de ANA y sacarosa en el enraizamiento *in vitro* de *Butia*

- odorata* (Barb. Rodr.) Noblick. *Iheringia*, 73(1), 13-21.
<https://doi.org/10.21826/2446-8231201873102>
- García, C., Furtado de Almeida, A.A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S., & Marelli, J.P. (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (137), 193-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- Guo, X. Q., Li, F., & Zhao, Y. B. (1998). Fluorescence investigation of the interaction of safranin T with DNA. *Analytical letters*, 31(6), 991-1005.
- Hassan, M.M., Allam, M.A., Shams El Din, I.M., Malhat, M.H. & Taha, R.A. (2021). High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from date palm immature inflorescences using picloram. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00129-y>
- Liu, Y., Wei, C., Wang, H., Ma, X., Shen, H., & Yang, L. (2021). Indirect somatic embryogenesis and regeneration of *Fraxinus mandshurica* plants via callus tissue. *Journal of Forestry Research*, 32(4), 1613-1625. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01199-3>
- Luis, Z.G., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2014). An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, (118), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0500-x>
- Meira, F.S., Luis, Z.G., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2019). Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. *Flora*, 250, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.11.011>
- Oliveira, L.B., De Mello, T., De Araujo, C.P., De Oliveira, J.P.B., Ferreira, A., Zanardo, T.É.C., Vieira, L.M., Otoni, W.O., Alexandre, R.S., & Carvalho, V.S. (2022). Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. *Scientia Horticulturae*, (299), Artículo 111051. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111051>

- Ree, J.F., & Guerra, M.P. (2015). Palm (*Arecaceae*) somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51, 589-602. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9722-9>
- Silva-Cardoso, I.M.D.A., Meira, F.S., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2022). The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.] Becc. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(8), 87. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>
- Steinmacher, D.A., Guerra, M.P., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2011). A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 108(8), 1463-1475. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr033>
- Vegas-García, A., Molleda, P., Ortega, D., Paredes, E., Gualoto, W., Quintero, L., y Baque, W. (2019). Efecto del sorbitol, manitol y la sacarosa en la germinación *in vitro* de embriones de palma africana. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 36, 247-264. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/31935/3180>
- Vilela, M.S.P., Santos, R.S., Stein, V.C., & Paiva, L.V. (2019). Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Revista árvore*, 43. <https://doi.org/10.1590/1806-90882019000100006>
- Welewanni, I., Perera, C., Jayasekera, A., & Bandupriya, D. (2020). Recovery, histological observations and genetic integrity in coconut (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli cryopreserved using encapsulation-dehydration procedure. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 48(2), 175 – 186. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v48i2.9538>
- Winkelmann, T. (2016). Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 25-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2

- Yan, R., Sun, Y., & Sun, H. (2020). Current status and future perspectives of somatic embryogenesis in *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), (143), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01916-0>
- Zhang, M., Wang, A., Qin, M., Qin, X., Yang, S., Su, S., Sun, Y., & Zhang, L. (2021). Direct and indirect somatic embryogenesis induction in *Camellia oleifera* Abel. *Frontiers in plant science*, 12, Artículo 644389. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.644389>