

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL
PROGRAMA DE MAESTRÍA ACADÉMICA EN CIENCIAS FORESTALES

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA MULTIPLICACIÓN MASIVA
DE *Hyeronima alchorneoides* POR MEDIO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MAGISTER EN CIENCIAS FORESTALES CON EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRÍA

Ing. JASON PÉREZ CHAVES

CARTAGO, COSTA RICA

Octubre, 2020

Acreditación

Trabajo final de graduación sometido al Tribunal Evaluador del Área Académica de Postgrado en Ciencias Forestales del Instituto Tecnológico de Costa Rica y aprobada como requisito parcial para optar por el grado de Magister.

“Desarrollo de un protocolo para la multiplicación masiva de *Hyeronima alchorneoides* por medio de embriogénesis somática”

Miembros del tribunal evaluador

PhD. Ana Abdelnour Esquivel
Tutora de Tesis

PhD. Alexander Berrocal Jiménez
Coordinador de Maestría

PhD. Olman Murillo Gamboa
Lector

PhD. Aura Inés Urrea Trujillo
Lectora

Ing. Jason Pérez Chaves

Sustentante

Desarrollo de un protocolo para la multiplicación masiva de *Hyeronima alchorneoides* por medio de embriogénesis somática

Resumen

Hyeronima alchorneoides es una especie forestal nativa de Costa Rica con madera de gran potencial industrial. Se caracteriza por presentar diversos problemas en su reproducción como baja viabilidad en las semillas y biología recalcitrante en el almacenamiento. Esto ha limitado la disponibilidad de material de siembra requerido para el establecimiento de plantaciones comerciales a mediana o gran escala. La propagación clonal *in vitro* es una biotecnología viable para este propósito y es una estrategia para aumentar el rendimiento de plantaciones comerciales al clonar masivamente en corto tiempo germoplasma élite. La embriogénesis somática es la metodología más promisoría para la propagación de árboles, debido a la posibilidad de producir semillas artificiales, almacenar y movilizar fácilmente el germoplasma y la oportunidad de manipulación genética. En el presente estudio se reporta la inducción de la embriogénesis somática indirecta en *H. alchorneoides* a partir de callos derivados de hojas. En el establecimiento se determinó que el tiempo en NaOCl fue un factor significativo en la asepsia y sobrevivencia de los explantes. El tipo de regulador en la inducción de callo embriogénico tuvo efectos significativos en las variables de respuesta, se produjeron callos al utilizar NAA, 2,4-D y picloram, encontrándose estructuras embriogénicas en 20% de los callos cultivados en picloram. En la etapa de proliferación se evaluó el efecto de tres concentraciones de picloram y tidiazuron en el subcultivo con respecto a las utilizadas en la inducción y se determinó que en presencia de tidiazuron un 45.2% de callos fueron embriogénicos y que el subcultivo en 100% o 50% de regulador en la proliferación permitió la mayor cantidad de callos embriogénicos que el medio sin reguladores en esta etapa. Se determinó que la línea de origen del callo no tuvo efecto significativo en la respuesta embriogénica. Tanto con el estereoscopio como con el microscopio electrónico de barrido se identificaron embriones somáticos en estadios de torpedo y globular. El presente es el primer reporte de inducción de embriogénesis somática en una especie de la familia Phyllanthaceae usando picloram y tidiazuron. La metodología descrita se proyecta como una base para la optimización de la propagación clonal masiva, la manipulación genética y el almacenamiento a largo plazo de la especie.

Palabras clave: silvicultura clonal, Picloram, Tidiazuron, Embriogénesis somática, Microscopía electrónica de barrido, Phyllanthaceae.

Development of a protocol of somatic embryogenesis for the massive propagation of *Hyeronima alchorneoides*

Abstract

Hyeronima alchorneoides is a native forestry species from Costa Rica. Its wood has shown an outstanding potential for industrial uses. Moreover, this species presents several reproductive problems such as low seed viability and recalcitrant storage behavior. Those problems have caused a limited availability of the required planting material for establishment of commercial plantations. *In vitro* clonal propagation is a viable and cost-effective biotechnology for this aim, and a strategy to increase the yield of the commercial plantations, because of the possibility of massive cloning the germplasm quickly. Somatic embryogenesis is considered one of the most promising methodologies for trees propagation. Somatic embryos could be used to produce artificial seeds, and those seeds could be stored and transported with ease. In addition, working with somatic calluses makes more feasible genetic manipulation and non-conventional biotechnological approaches for breeding. Presently, we report an indirect somatic embryogenesis method for the propagation of *H. alchorneoides*, using foliar segments for calluses induction. Initially, surface sterilization of explants was evaluated by incubating them in different concentrations of NaOCl and H₂O₂ for several periods, and it was determined that incubation time in NaOCl was the only significant factor in the survival and aseptic number of explants. Afterwards, in the induction of calluses was determined that the plant growth regulator caused significant effects in the response variables. It was possible to produce calluses with NAA, 2,4-D and picloram, moreover, embryogenic structures were only identified in 20% of the cultures with picloram. In the proliferation stage, we evaluated the effect of three concentrations of picloram and three concentrations of thidiazuron in the subculture medium with respect to the ones used in the induction. Here we determined that 45.2% of cultures with thidiazuron showed embryogenic structures, and calluses subcultured in presence of 100% or 50% during the proliferation stage made possible the production of more embryogenic calluses compared to the subculture in a medium free of growth regulators. Additionally, it was determined that the genetic origin of the calluses (line) did not cause significant effects in the response variables. Using both the stereo microscope and the scanning electron microscope, we observed somatic embryos in torpedo and globular stages. The present report described the first methodology for somatic embryogenesis in a species of the Phyllanthaceae family using thidiazuron and picloram, and is expected to support the clonal propagation, genetic manipulation and cryopreservation of *H. alchorneoides*.

Keywords: clonal forestry, Picloram, Thidiazuron, Somatic Embryogenesis, Scanning electron microscopy, Phyllanthaceae.

Agradecimientos

A Dios, a mi familia, a Laura, a mis amigos que me apoyaron en este esfuerzo.

A la profe Ana, gracias por inspirarme, empujarme y ser mi guía y ejemplo a seguir.

A la profe Vilma y los asistentes del Laboratorio de Crioconservación del CIB.

A la profe Aura por aceptar corregir este trabajo y su guía en el desarrollo de este.

A la Red BioAli.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por el financiamiento.

Al Dr. Olman Murillo por facilitar el material vegetal usado en esta investigación.

Índice general

Acreditación.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Agradecimientos	iv
Índice general.....	v
Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros	x
Introducción	1
Objetivos.....	3
Hipótesis	3
Objetivos.....	3
Planteamiento del problema	4
Justificación	6
Revisión de literatura	7
<i>Hieronyma alchorneoides</i>	7
Reforestación comercial.....	7
Sistemas de producción de plántulas para la reforestación	8
Problemas de la reproducción de <i>H. alchorneoides</i>	9
Cultivo de tejidos vegetales.....	10
Materiales y métodos	12
Establecimiento <i>in vitro</i>	12
Recolecta del material	12
Desinfección de hojas.....	12
Diseño experimental.....	12
Inducción de la embriogénesis somática	13

Inducción de callo	13
Proliferación de callo embriogénico	13
Diseño experimental.....	14
Análisis de los callos por microscopía electrónica de barrido	15
Resultados	16
Establecimiento <i>in vitro</i>	16
Inducción de la embriogénesis somática	17
Inducción de callo	17
Proliferación del callo embriogénico.....	19
Análisis de los callos por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	27
Discusión	31
Conclusiones	36
Literatura citada	37

Índice de figuras

- Figura 1. Frutos de *Hieronima alchorneoides*: (a) en diferentes estadios de maduración; (b) fruto dañado por insectos de la familia Eurytomidae..... 9
- Figura 2. Proporción de explantes de *Hieronima alchorneoides* contaminados y necrosados después de su desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y cultivo *in vitro* por dos semanas. En la figura se muestran las medias \pm desviación estándar. Los valores de p en cada variable de respuesta se obtuvieron por medio de un modelo lineal general con un $\alpha \leq 0.05$ 16
- Figura 3. Respuesta de explantes de *Hieronima alchorneoides* al cultivo *in vitro* en presencia de diferentes reguladores de crecimiento (ácido-2,4-diclorofenoxiacético, ácido naftalenacético y ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), después de ocho semanas. En la Figura 3 se muestran las medias \pm desviación estándar. Los valores de p de cada variable de respuesta se obtuvieron al analizar los datos por medio de un modelo lineal general con un $\alpha \leq 0.05$ 17
- Figura 4. Inducción de callo en explantes de *Hieronima alchorneoides* cultivados por ocho semanas en oscuridad en el medio de inducción de callo basal complementado con (A) Control sin reguladores, (B) 2.26 μ M 2,4-D, (C) 1.34 μ M NAA y (D) 4.14 μ M picloram. En el recuadro en (D) se muestran los embriones somáticos observados en el estereoscopio. Barra de escala: A-C = 2 cm; D = 2 mm..... 18
- Figura 5. Efecto de los tratamientos de proliferación en la proporción de callos de *Hieronima alchorneoides* con presencia de masas proembriogénicas (PEM). Los factores estudiados fueron: (A) Tipo de regulador de crecimiento, (B) Línea de origen del callo y (C) Concentración del regulador utilizada en la proliferación con respecto a la utilizada en la inducción. En los gráficos se muestra la significancia de cada factor obtenida de los análisis por modelo lineal general. El método de comparación utilizado fue el de Tukey con un valor crítico de $p < 0.05$. Las medias de los tratamientos que presentaron letras en común en cada factor no fueron significativamente diferentes..... 21
- Figura 6. Respuesta de los callos embriogénicos de *Hieronima alchorneoides* a los tratamientos de proliferación evaluados. Gráficos de cajas (A-D) corresponden a la relación entre el factor “tipo de PGR” y las medianas del porcentaje de tejidos que presentaron las variables de respuesta. (A) presencia de masas proembriogénicas. (B) callos necróticos. (C)

callos hiperhidratados. (D) callos en crecimiento. Gráficos de cajas (E-H) corresponden a la relación entre los niveles del factor “Concentración de PGR” utilizada en la proliferación y las medianas variables de respuesta. (E) presencia de masas proembriogénicas. (F) callos necróticos. (G) callos hiperhidratados. (H) callos en crecimiento. Evaluación realizada después de 8 semanas de cultivo en oscuridad en cada uno de los tratamientos. Si las hendiduras de dos cajas no se traslapan existe suficiente evidencia estadística para afirmar que las dos medianas son significativamente diferentes, con una significancia de 0.05 23

Figura 7. Respuesta de los callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados en los tratamientos de proliferación. (A) Callos inducidos en 12.42 μ M picloram y subcultivados en 50% de este regulador para inducir su proliferación. (B) Callos inducidos en 6.81 μ M tidiazuron y subcultivados en 100% de este regulador para inducir su proliferación. (C) Embrión somático en germinación producido a partir de callo inducido en 4.14 μ M picloram y subcultivado en 2.07 μ M picloram durante la proliferación. (D) Embriones somáticos en estadio globular producidos a partir de callo inducido en 9.08 μ M tidiazuron y subcultivado en la misma concentración durante la proliferación. Flecha negra en A señala embriones en estadio torpedo, flecha blanca en A señala embriones en estadio globular. Flecha negra en B señala apariencia del callo no embriogénico, flechas blancas en B señalan la apariencia del callo embriogénico, flecha verde en B señala embriones en estadio globular. Barra de escala: A, B = 0.5 cm, C, D = 1 cm..... 24

Figura 8. Correlograma de las relaciones entre las variables del experimento de proliferación de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides*. Análisis realizado con un nivel de significancia menor o igual a 0.05. La escala de color indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson para cada par de variables. Correlaciones no significativas se indican con coloración blanca en el correlograma..... 26

Figura 9. Micrográficas obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de los callos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados en el medio de inducción por 8 semanas. (A) Callo inducido en 1.34 μ M NAA (ácido naftalenacético). (B) Callo inducido en 2.26 μ M 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético). (C) Células en división celular asimétrica del callo inducido en 4.14 μ M picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico). (D) Tejido epidérmico iniciando la formación de callo, se observa una región con un centro meristemático (MC). La flecha negra en C señala una diada producida por una división celular anticlinal. Barra de escala: A = 500 μ m; B = 200 μ m; C = 50 μ m; D = 500 μ m..... 27

Figura 10. Embriogenesis somática de *Hyeronima alchorneoides* observada en el microscopio electrónico de escaneo después del cultivo en el medio de proliferación por 8 semanas. (A) Apariencia del callo embriogénico inducido en 8.28 μM picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y subcultivado en ausencia de reguladores durante la proliferación. (B) Apariencia de la superficie del callo embriogénico inducido en 4.54 μM tidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea) y subcultivado en la misma concentración de regulador (100%) en la etapa de proliferación. (C) Vista detallada de embrión somático en estadio de torpedo producido a partir de callo embriogénico inducido en 8.28 μM picloram y subcultivado en 0 μM picloram por 8 semanas. (D) Vista detallada de embriones somáticos globulares formados a partir del callo embriogénico inducido y subcultivado en 4.54 μM tidiazuron en la etapa de proliferación. Nótese la presencia de material extracelular (ECM) membranoso cubriendo algunos de los embriones somáticos (flecha blanca). Barra de escala: A-C= 1 mm; D =50 μm . 29

Índice de cuadros

Cuadro 1. Concentración de los reguladores de crecimiento ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) y 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (TDZ) evaluadas en el medio basal para la proliferación de callos embriogénicos de <i>Hyeronima alchorneoides</i>	14
Cuadro 2. Efecto del tipo de regulador de crecimiento (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea y ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), la línea y la concentración del regulador (medio sin reguladores, medio con 50% o 100% de regulador con respecto a la usada en la inducción) en el medio de proliferación, analizados como predictores en la respuesta de producción de masas proembriogénicas (PEM) en callos de <i>Hyeronima alchorneoides</i> cultivados durante 8 semanas en oscuridad a 25 ± 3 C. Este análisis se realizó mediante diferentes ajustes de modelo lineal general con una función de enlace logit.....	19

Introducción

La propagación clonal de árboles y especies forestales de alto valor, por medio de embriogénesis somática, tiene el potencial de maximizar el aprovechamiento de los beneficios de los programas de mejoramiento genético, así como incrementar la uniformidad y la calidad de los individuos y lotes en los viveros (Montalbán et al., 2010). La propagación de especies forestales por embriogénesis somática ha demostrado ser la única alternativa para resolver problemas enfrentados en otros tipos de propagación vegetativa, como las bajas tasas de multiplicación, bajo enraizamiento, pérdida de dominancia apical o plagiotropismo entre otros (Pais, 2019). De esta forma, la biotecnología se convierte en un apoyo para el avance en el mejoramiento genético y la conservación de germoplasmas de interés.

La presión puesta en las especies forestales por la creciente demanda de sus productos ha sido parcialmente resuelta por la aplicación de metodologías biotecnológicas (Hazubska-Przybył y Bojarczuk, 2016). Entre estas, el cultivo de tejidos representa no solamente una plataforma para la propagación masiva, sino que su potencial aplicación trasciende hasta programas de conservación de germoplasma a largo plazo y mejoramiento no convencional como la inducción de mutantes y la selección masiva de líneas de interés, así como la transformación de genotipos con características como tolerancia a herbicidas, resistencia a estrés abiótico y a plagas y enfermedades, entre otras (Guan et al., 2016).

En la actualidad, las técnicas de cultivo de tejidos son ampliamente utilizadas en la micropropagación comercial de diferentes especies (Vives *et al.* 2017), producción de plantas libres de enfermedades (Carvalho *et al.* 2017), producción de plantas haploides y doble haploides (Hoveida *et al.* 2017), inducción de variación genética para la selección de variantes de interés (Braatz *et al.* 2017), producción de embriones somáticos (Georget *et al.* 2017), fusión de protoplastos (Del Bosco *et al.* 2017), entre otros múltiples usos. Estas herramientas biotecnológicas son esenciales para la investigación y son el punto de partida para el desarrollo de soluciones a problemas enfrentados por diferentes sectores productivos, especialmente de aquellos que trabajan con especies con problemas de reproducción.

Hyeronima alchorneoides es una especie forestal nativa de Costa Rica y Centroamérica, de gran interés para el sector forestal de la región por las características de su madera y los servicios ambientales que puede ofrecer en plantaciones comerciales y de conservación (Alvarado 2016, Solís y Moya 2003, Ribozi et al 2017). Esta especie presenta problemas de reproducción ampliamente conocidos, como su biología recalcitrante que dificulta la conservación de genotipos (Abdelnour-

Esquivel et al 2007), la baja viabilidad de sus semillas que presentan tasas de germinación de hasta 5% o menores (Montero et al 2007), las épocas de floración de individuos masculinos y femeninos no siempre coinciden (González-Jiménez y Fisher 1989; Lobo *et al.* 2008), así como el ataque de sus frutos y semillas por avispas de la familia Eurytomidae (Valverde-Cerdas *et al.* 2013; Abdelnour-Esquivel et al 2007), entre otras.

Todas estas dificultades reproductivas han sido de central interés en los programas de mejoramiento genético de GENFORES (Murillo et al 2016), que han resuelto parcialmente la alta demanda de material de siembra de la especie mediante la propagación de genotipos superiores en jardines clonales. Investigaciones previas han demostrado que el cultivo de tejidos (Abdelnour-Esquivel et al 2007) y la embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos como material de partida (Valverde-Cerdas et al 2013) es posible en *Hyeronima alchorneoides*, sin embargo, no se ha desarrollado un protocolo de embriogénesis somática que permita mantener las características de los genotipos superiores y permita recuperar la juvenilidad de los clones élite seleccionados. Asimismo, se espera que la embriogénesis somática de *H. alchorneoides* sea una plataforma para la producción de material de siembra vegetativo de la más alta calidad y permita la producción de tejidos en el laboratorio de estos genotipos para el desarrollo de investigaciones en mejoramiento genético no convencional y crioconservación. Por esto, la presente investigación se desarrolló con el objetivo de establecer un protocolo para la inducción y proliferación de embriones somáticos a partir de hojas de *H. alchorneoides*. En primer lugar, las concentraciones de los desinfectantes para el cultivo *in vitro* de los segmentos de hoja fueron determinadas. Después, callos proembriogénicos fueron obtenidos a partir del cultivo de los explantes en medios con picloram y tidiazuron y estos callos fueron subcultivados en medios para la proliferación y regeneración de los embriones somáticos.

Objetivos

Hipótesis

La producción de embriones somáticos a partir de segmentos de hoja de *H. alchorneoides* es posible y esos embriones podrían utilizarse como material de partida para la propagación masiva de esta especie.

Objetivos

General

Evaluar un protocolo para la inducción y regeneración de embriones somáticos a partir de hojas de *H. alchorneoides*.

Específicos

1. Determinar las concentraciones de los desinfectantes para el establecimiento aséptico de *H. alchorneoides*.
2. Determinar las concentraciones de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo *in vitro* de inducción de callo embriogénico, utilizando hojas de *H. alchorneoides* establecidas asépticamente.
3. Evaluar condiciones de cultivo para la proliferación de los callos embriogénicos de *H. alchorneoides*.

Planteamiento del problema

Hieronyma alchorneoides (pilón) es una especie nativa con sobresaliente adaptación a diversas condiciones de suelos y gran valor comercial debido a la calidad de su madera. Posee potencial para la industria tanto en el sector de la construcción como en la ebanistería. Sin embargo, su aprovechamiento, conservación y mejoramiento han sido limitados al ser una especie con problemas reproductivos. Principalmente se mencionan heterogeneidad en la maduración de frutos, daños en las semillas por insectos, así como su pérdida de viabilidad por presentar biología recalcitrante al almacenamiento (Valverde-Cerdas et al. 2013).

El comportamiento recalcitrante en las semillas de *H. alchorneoides* se da en dos sentidos: (1) pierde viabilidad al disminuirse su porcentaje de humedad y (2) pierde viabilidad al disminuirse su temperatura. Estos factores son primordiales en el almacenamiento de semillas, ya que la deshidratación de los tejidos evita el daño a las membranas celulares por la expansión y cristalización del agua intracelular al disminuir la temperatura para mantener el metabolismo en condición latente (Elzenga y Bekker 2017).

Ante esta problemática, en el país se ha establecido la reproducción clonal de árboles plus por miniestacas en jardines clonales. Sin embargo, se tiene la limitante de producir una planta a partir de una miniestaca, lo que restringe la tasa de multiplicación en el tiempo y adicionalmente, se hace necesario realizar una renovación de las plantas del jardín clonal cada dos años, con el fin de restaurar su juvenilidad y mantener una alta tasa de producción de nuevos brotes. Los estudios de Abdelnour-Esquivel et al. (2011) y Valverde-Cerdas et al. (2013) permitieron avanzar en los esfuerzos de conservación y propagación *in vitro* de la especie, sin embargo, el primer protocolo no provee de un medio para la rejuvenilización de los clones, y en el segundo estudio se partió de embriones cigóticos, lo cual imposibilita la clonación del germoplasma de interés.

Por esto, es necesario unificar los aspectos positivos de ambos estudios y así lograr avanzar en técnicas de mejoramiento modernas y la conservación en bancos para especies con características especiales como lo es *H. alchorneoides*. La propagación *in vitro* con tejidos somáticos permite la expresión de una baja variabilidad genética y al utilizar las hojas de las plantas donadoras como explante, se asegura que se copie el genoma del individuo y se tiene gran cantidad de tejido viable y joven para la propagación (Shahzad et al. 2017).

La inducción de embriogénesis utilizando tejidos somáticos para el proceso de propagación, permite obtener propágulos rejuvenecidos y con genomas idénticos a la planta madre. En esta metodología, el embrión puede provenir de diferentes tejidos no cigóticos como tejido radical, dérmico, hojas,

tallos, ápices, yemas, etc. En especies forestales el desarrollo de metodologías de embriogénesis somática es el punto de partida para su aprovechamiento a mayor escala, por la posibilidad de producción de gran cantidad de material de siembra de calidad y mejorado. Al mismo tiempo posibilita la conservación de especies recalcitrantes y el mejoramiento genético no convencional como por inducción de mutaciones y por ingeniería genética. Adicionalmente, la implementación de crioconservación de germoplasma requiere de técnicas de cultivo de tejidos optimizadas previamente (Rajasekharan y Sahijram 2015).

Debido a que no se cuenta con protocolos para la rejuvenilización y propagación masiva de clones élite de *H. alchorneoides*, se propuso el desarrollo del presente trabajo. Los problemas de reproducción, recalcitrancia de la semilla y ataques de plagas evidencian que, la forma más segura para la conservación en condiciones controladas de este germoplasma es la crioconservación, técnica que requiere del desarrollo previo de los protocolos para el cultivo de tejidos. También, es importante tener en cuenta también que con el paso del tiempo, aquellos materiales mejorados y en crecimiento activo van perdiendo su potencial de multiplicación y regeneración, por lo que el desarrollo de la presente investigación para la propagación por embriogénesis somática también apoyará los esfuerzos realizados en mejoramiento genético en la especie en el país.

Justificación

La técnica de cultivo *in vitro* por micropropagación emplea pequeñas secciones de tejido para la multiplicación masiva de plantas en el medio de cultivo líquido o semisólido. De esta forma se obtiene una tasa de propagación mayor que al utilizar el enraizamiento de estacas. Las tasas de multiplicación se pueden aumentar al utilizar técnicas de cultivo de tejidos más especializadas como la embriogénesis somática (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2012).

La embriogénesis somática consiste en la producción de embriones generados a partir de células diferentes a las sexuales, por lo tanto, permite la producción de plantas genéticamente idénticas a la planta donadora del explante, con tasas de multiplicación generalmente muy altas (Vives et al. 2017). La técnica se inicia al cultivar explantes asépticamente en medios de cultivo de inducción con reguladores de crecimiento como el 2,4-D, picloram, bencilaminopurina o tidiazuron entre otros, que inducen la desdiferenciación celular para realizar una posterior modificación en las rutas metabólicas de las células que redirigirán el desarrollo de los tejidos para la producción de embriones somáticos, muy similares a los embriones cigóticos en su anatomía y fisiología, pero con una constitución genética idéntica a la del tejido madre a partir del cual fueron inducidos (Loyola-Vargas 2016).

El potencial para la propagación masiva de plantas de la embriogénesis somática representa una técnica estratégica para incluir en programas de mejoramiento genético, conservación de germoplasma, mutagénesis y transformación genética para inducir resistencia a factores ambientales o mejorar la productividad en cultivos (Castander-Olarrieta et al. 2020). La crioconservación de frutos y semillas de *H. alchorneoides* ha sido reportada (Abdelnour-Esquivel et al. 2007) pero se observaron las limitantes señaladas que este tipo de tejidos representó en el proceso. Además, no ha sido evaluada ninguna metodología de crioconservación en los genotipos mejorados y silvestres de *H. alchorneoides*, para esto es imperativo el desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos. Asimismo, el establecimiento de este tipo de protocolos permitiría el apoyo para el desarrollo de programas de mejoramiento existentes en la actualidad.

Revisión de literatura

Hieronyma alchorneoides

Hieronyma alchorneoides es una especie forestal nativa de Costa Rica y Centroamérica, que crece en condiciones de altas precipitaciones (de 2000 a 5000 mm), en sitios con temperatura superiores a 25°C la mayor parte del año, y en regiones con una altitud no mayor a 800 msnm (Montero, de los Santos Posadas y Kanninen 2007). Es una especie con un alto valor comercial y ecológico (Solís y Moya 2003) de rápido crecimiento, que pertenece a la familia Phyllanthaceae, y llega a alcanzar alturas de 30 a 45 m y diámetro de hasta 1,7 m. Su fuste es recto y cilíndrico con gambas bien desarrolladas, libre de ramas hasta unos 20 m o más (Alvarado 2016), por esto el aprovechamiento de su madera es alto.

La madera es apreciada en el mercado por su valor estético y en la construcción (Solís y Moya 2003). Es de un color marrón a rojizo en el duramen y con una albura de un tono casi rosado o anaranjado tenue. Su olor o sabor no son característicos, presenta un lustre medio o bajo con textura fina y las fibras pueden rasgarse al cepillarse (Solís y Moya 2003). Es una madera bastante densa y pesada, de resistencia moderada a la pudrición y ataque de algunos insectos como las termitas (Tenorio *et al.* 2016). Puede presentar algunas torceduras y colapsos debidos al método de secado (Alvarado 2016). Por su resistencia, es comúnmente utilizada en construcción pesada como en durmientes de ferrovías, pilotes de fundación, puentes, horcones, vigas, carrocerías de camiones y construcción de embarcaciones (Montero, de los Santos Posadas y Kanninen 2007).

Reforestación comercial

Dada la alta demanda por madera, fibra y biocombustibles, las plantaciones forestales han adquirido importancia económica y muchas empresas han mostrado interés por invertir en la producción de árboles (Siyag 2014). El gobierno de Costa Rica ha gestionado esfuerzos y compromisos para incentivar la producción sostenible de la madera y la restauración de los paisajes boscosos por medio de pagos por servicios ambientales y canje de deuda de carbono (Brancalion y Chazdon 2017). En este sentido, el rescate, conservación y uso de *H. alchorneoides* mejorada genéticamente ha venido en aumento, principalmente para la utilización en plantación de zonas de restauración o para la producción de madera bajo el modelo de silvicultura (Malkamaki *et al.* 2017).

Muchas iniciativas exitosas han contribuido para la transformación de zonas degradadas con la ayuda de plantaciones forestales (Vidal *et al.* 2016), que aunado al aprovechamiento comercial responsable, se han alcanzado resultados notables en la restauración y protección de suelos (Siyag 2014). Sin

embargo, las plantaciones forestales de monocultivo tienen algunas desventajas, entre las que se citan la pérdida de diversidad en especies de aves y abejas (Brancalion y Chazdon 2017) y el riesgo aumentado de propagación de plagas o enfermedades (Mayoral *et al.* 2017). Las plantaciones forestales comerciales tienen varios impactos en la biodiversidad local, sin embargo, con el cultivo y uso de especies nativas en la producción de madera se pueden mitigar muchos de los efectos negativos del monocultivo forestal (Subiakto *et al.* 2016). De ahí la importancia que una especie nativa productora de madera con las características de *H alchorneoides* pueda ser utilizada exitosamente en las plantaciones forestales de Costa Rica.

Un aspecto importante que destaca a nivel mundial es que se ha reportado que la plantación de especies forestales exóticas en los trópicos ha disminuido considerablemente la biodiversidad (Huettmann y Schmid 2015). La reforestación se ha enfocado principalmente en la restauración de la capacidad productiva maderera de los bosques como único objetivo, y en muchos casos no se ha considerado la recuperación de la biodiversidad y de los servicios ambientales que los bosques pueden proveer (Subiakto *et al.* 2016). Por esto, el uso de una mayor variedad de especies nativas como *H. alchorneoides* ha cobrado importancia en los programas de mejoramiento genético, reforestación y conservación (Ribozi *et al.* 2017; Lu *et al.* 2017).

Sistemas de producción de plántulas para la reforestación

La propagación de árboles de forma masiva aumenta considerablemente la cantidad individuos disponibles para la reforestación comercial o de restauración (Lamboll *et al.* 2017). En condiciones de bosque, la sobrevivencia de las plántulas producidas a partir de semillas y conversión en árbol es de alrededor de 1%, sin embargo, al multiplicar plantas en condiciones mejoradas para la propagación, como en un invernadero, el éxito aumenta de forma considerable (Lindgren 2016). Así es posible reducir los costos para la producción de una gran cantidad de plantas sanas y vigorosas que incluso pueden utilizarse para iniciar nuevos ciclos de propagación.

La propagación vegetativa de árboles como un método de reproducción de nuevos individuos, a través de la regeneración de tejidos somáticos, ha venido en aumento en los programas de mejoramiento genético (Varshney y Anis 2015). Este tipo de propagación fija los rasgos deseables que han sido mejorados, debido a que la progenie obtenida va a tener el mismo genotipo que el árbol donador, es decir, será su clon (Hazubska-Przybyt y Bojarczuk 2016). Por esto, es de gran importancia contar con protocolos para el mantenimiento y conservación de líneas resistentes a plagas, enfermedades, condiciones ambientales adversas y más productivas, que son de interés para los productores forestales (Rajpal *et al.* 2016).

Entre las técnicas más utilizadas para la propagación clonal de especies forestales se encuentra la del enraizamiento de miniestacas (Yan *et al.* 2016). En esta técnica se toman pequeñas estacas a partir de una planta adulta, y son colocadas en condiciones ideales para la brotación de raíces laterales, por ejemplo alta humedad relativa, presencia de auxinas y temperatura entre 25 y 30 °C para especies tropicales (Varshney y Anis 2015). En este tipo de propagación, se deben enfrentar problemas fisiológicos y falta de juvenilidad en el enraizamiento, además, el porcentaje de miniestacas que sobreviven desde la poda, el transporte y el trasplante final es frecuentemente bajo (Yan *et al.* 2016).

Problemas de la reproducción de *H. alchorneoides*

Los frutos de *H. alchorneoides* son drupas elipsoides indehiscentes, de 3-5 mm de diámetro, que van cambiando de color verde a rojo y púrpura en la madurez (Figura 1a; Solís y Moya, 2003). Cada fruto se compone de seis semillas, pero muy pocas suelen presentar viabilidad, debido al ataque de insectos de la familia Eurytomidae (Figura 1b), entre otras razones, por lo que la obtención de material de siembra por medio de semillas es ineficiente (Montero *et al.* 2007). Esta especie presenta alto valor ecológico en los hábitats donde se distribuye, debido a que la pulpa de sus frutos es carnosa y de sabor dulce, siendo muy atractivos y consumidos por varias especies de pájaros que diseminan sus semillas en el bosque (Montero *et al.* 2007).

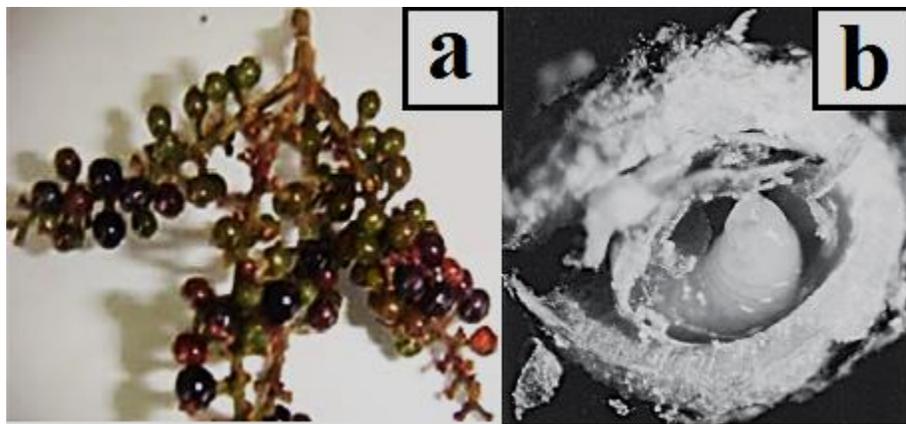


Figura 1. Frutos de *Hieronyma alchorneoides*: (a) en diferentes estadios de maduración; (b) fruto dañado por insectos de la familia Eurytomidae.

Fuente: Valverde-Cerdas *et al.* 2013; Abdelnour-Esquivel, Rojas y Alfaro 2007.

La biología de muchas de las especies tropicales y las condiciones climáticas en que crecen les permiten germinar sin tener que pasar por un periodo de latencia, i.e. alta temperatura y humedad todo o la mayor parte del año (Elzenga y Bekker 2017). *H. alchorneoides* es una especie dioica, de la cual no se conoce con certeza la frecuencia entre árboles masculinos y femeninos, por lo que es

posible que exista un desbalance entre las poblaciones de árboles de uno u otro sexo (Solís y Moya 2003). La floración y fructificación de *H. alchorneoides* se ve fuertemente influenciada por factores climáticos como la precipitación y la temperatura (González-Jiménez y Fisher 1989; Lobo *et al.* 2008). Asimismo, sus semillas presentan un metabolismo persistentemente activo (Urrego y Valle 2001), por lo que la especie presenta un comportamiento recalcitrante cuando es almacenada y presenta problemas de reproducción en forma natural en los bosques. Es así que para la reproducción y almacenamiento exitosos de especies problemáticas las técnicas de cultivo de tejidos y la criopreservación son de las opciones más adecuadas.

Cultivo de tejidos vegetales

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales fueron desarrolladas como un medio para analizar problemas experimentales en la biología y fisiología de plantas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2012). En la actualidad son utilizadas ampliamente en la micropropagación comercial de diferentes especies (Vives *et al.* 2017, Bhojwani y Dantu 2013), producción de plantas libres de enfermedades (Carvalho *et al.* 2017), producción de plantas haploides y doble haploides (Hoveida *et al.* 2017), inducción de variación genética para la selección de variantes de interés (Braatz *et al.* 2017), producción de embriones somáticos (Georget *et al.* 2017), fusión de protoplastos (Del Bosco *et al.* 2017), entre otros múltiples usos. Estas herramientas biotecnológicas confieren grandes ventajas para la investigación y la producción comercial de plantas o productos vegetales.

La propagación clonal *in vitro* provee plantas idénticas a la planta madre, utilizando técnicas de cultivo de tejidos (Shahzad *et al.* 2017). Por ejemplo, especies en peligro de extinción, amenazadas o raras (poco comunes o estudiadas) han sido propagadas exitosamente por micropropagación debido a la alta tasa de multiplicación utilizando un número mínimo de especímenes para el inicio del cultivo (Kane *et al.* 2016). La micropropagación de plantas puede darse en tres diferentes vías: (1) iniciando con yemas axilares, que generarán nuevos brotes; (2) regeneración directa de brotes apicales o embriones somáticos para la producción de nuevos brotes y plantas; y (3) regeneración indirecta de brotes o embriones somáticos a partir de callos (Singh 2015).

El cultivo de yemas o meristemos axilares para la producción de plantas, ha sido la técnica de producción de vitroplantas más ampliamente utilizada (Shahzad *et al.* 2017). Este método provee alta estabilidad genética y es fácilmente adaptable a la mayoría de especies vegetales (Kane 2011). Consecuentemente, este método de cultivo ha jugado un rol de gran importancia para el desarrollo de una industria mundial que produce más de 250 millones de plantas anualmente (Kane 2011). Además de la propagación, los meristemos pueden cultivarse *in vitro* tanto para la producción de plantas libres

de patógenos como para la conservación de germoplasma en condiciones asépticas (Rajasekharan y Sahijram 2015).

La organogénesis o embriogénesis de forma directa por su parte, es una técnica menos utilizada para la propagación vegetativa de plantas, debido a su bajo rendimiento en la producción de nuevos individuos y a la amplia disponibilidad de técnicas más sencillas u otras complejas pero con una mayor producción de plantas como la organogénesis o embriogénesis de forma indirecta (Kane 2011). El cultivo inicia con un tejido somático del que se producen múltiples brotes o embriones somáticos, sin la necesidad de producir un callo (Kahia *et al.* 2016). Se prefiere la utilización de la organogénesis o embriogénesis somática directa cuando es necesario mantener una alta estabilidad genética del material a propagar y no se requiere una alta frecuencia de producción de plantas (Loyola-Vargas 2016).

La embriogénesis somática es la reprogramación de las células de la planta para que desvíen su desarrollo ontogénico hacia la formación de embriones (Loyola-Vargas 2016). Estos embriones tienen una morfología y desarrollo igual al de los embriones sexuales, pero su genoma será idéntico al de las células que les dieron origen (Germanà y Lambardi 2016). La embriogénesis somática se da gracias a las características de totipotencia y plasticidad celular, es decir, todas las células de una planta poseen la capacidad y potencia genética para la formación de una planta completa y que será genéticamente idéntica a ella (Hand *et al.* 2016).

El presente trabajo se plantea con el objetivo de desarrollar un protocolo para la propagación masiva de embriones somáticos de *Hieronyma alchorneoides*. A mediano y largo plazo, se espera que este tipo de metodologías apoyen los programas de conservación y mejoramiento genético de la especie y se espera que este trabajo sea una plataforma aplicable a otras especies de interés para el sector forestal nacional y de la región.

Materiales y métodos

Establecimiento *in vitro*

Recolecta del material

Como material experimental se utilizaron plantas de *Hyeronima alchorneoides* obtenidas a partir de semillas. Las plántulas fueron mantenidas en el invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología, que mantuvo temperaturas entre 18 a 26 C y humedad mayor a 95% durante el desarrollo de la investigación. Estas plantas fueron fertilizadas de forma foliar cada 4 semanas con 5 ml/L de Bayfolan ® complementado con 2 mg.L⁻¹ ácido naftalenacético (NAA) y 2X vitaminas según las recomendaciones de Murashige y Skoog (MS 1962). La frecuencia de riego fue de aproximadamente 1 a 2 veces por semana dependiendo de las condiciones de humedad. Las plantas fueron asperjadas cada 2 a 3 semanas con 5 g.L⁻¹ de Zetarán ® y 5 g.L⁻¹ Afungil ® mezclados.

Desinfección de hojas

Hojas jóvenes de *H. alchorneoides* mantenidas en el invernadero, fueron desinfectadas utilizando una doble incubación primero en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2 o 3 % (v/v) en tiempos de 10 o 20 min cada una, después fueron incubadas en soluciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,5 o 1 % (v/v) por 2 o 3 min. Pasado el periodo de incubación en los desinfectantes, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar por 2 min cada uno y las hojas desinfectadas fueron reducidas en segmentos de aproximadamente 1 cm² (explante) que incluyeron secciones de vena principal o secundaria. Estos explantes fueron incubados por 2 min en la solución 40% (v/v) de supresor microbiológico SB de la casa comercial Laboratorios ARVI S.A. (Methylisothiazolone (2-methyl-4-isothiazolin-3-one, MIT) and Methylchlorisothiazolinone (5-chloro-2-methyl-4- isothiazolin-3-one, CIT)), reactivos Químicos Gamma, Laboratorios ARVI S.A). Los explantes desinfectados fueron cultivados en el medio compuesto por las sales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (MS, 1962), a un pH de 5,6 y gelificado con Gelzan ® previo a la esterilización en autoclave a 121 C por 25 min. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de oscuridad a 25 ± 3 C para su establecimiento *in vitro*.

La evaluación se realizó cada semana durante tres semanas, contabilizando los explantes contaminados, asépticos y oxidados (necrosados). Para continuar con la etapa de inducción de la embriogénesis somática se utilizó la metodología que permitió el mayor número de explantes asépticos y menor número de explantes oxidados.

Diseño experimental

Los experimentos de desinfección de hojas fueron evaluados en un diseño factorial 2^4 . La variabilidad de estos datos fue analizada mediante modelo lineal general con distribución binomial y una función de enlace logit, con una significancia menor o igual a 0,05 para cada variable evaluada (explantes contaminados, explantes asépticos, explantes oxidados). Los factores fueron: (1) La concentración de NaOCl (2 niveles= 2 o 3 %), (2) el tiempo de incubación en esta solución (2 niveles= 10 o 20 min), (3) la concentración de H₂O₂ (2 niveles= 0,5 o 1 %), y (4) el tiempo de incubación en esta solución (2 niveles= 2 o 3 min). Cada tratamiento (combinación de factores) fue repetido tres veces, con 10 unidades experimentales (explantes) cada repetición, determinando a priori el tamaño de la muestra para obtener una potencia mayor a 90%. Las medias de contaminación, explantes asépticos y oxidación, fueron comparadas por el método de Tukey HSD (*Honest Significant Differences*).

Inducción de la embriogénesis somática

Inducción de callo

Los explantes desinfectados fueron inoculados en el medio de cultivo para la inducción de callo embriogénico, compuesto por las sales MS y vitaminas B5 (Gamborg *et al.* 1968) suplementado con 300 mg.L⁻¹ de L-prolina y 200 mg.L⁻¹ de L-cisteína, 300 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada y 3% (m/v) de sacarosa, con un pH ajustado a 5,8 (medio basal, MB), medio similar a los recomendados por Syombua *et al.* (2019), Kahia *et al.* (2016) y Rahman *et al.* (2017), y una concentración de reguladores de crecimiento tipo auxinas 2.26 µM ácido-2,4-Diclorofenoxiacético (2.4-D), 1.34 µM ácido naftalenacético (NAA) o 4.14 µM ácido 4-amino-3,5,6- tricloropicolínico (picloram), gelificado con Gelzan ® previo a la esterilización en autoclave a 121 C por 20 min. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad a 25 ± 3 C. La formación de callos embriogénicos fue evaluada después de ocho semanas visualizando los tejidos en el estereoscopio y microscopio electrónico de barrido. Según los resultados obtenidos, únicamente el cultivo en presencia de picloram permitió la producción de callos embriogénicos, por lo que este regulador fue seleccionado a partir de este primer ensayo para evaluar en los experimentos de proliferación junto con el regulador 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (TDZ).

Proliferación de callo embriogénico

Segmentos de hoja de 1 cm² fueron cultivados por 8 semanas en el medio basal complementado con 4.14, 8.28 o 12.42 µM picloram o 4.54, 9.08 o 13.62 µM TDZ. Los callos inducidos fueron seleccionados para establecer líneas de callos embriogénicos. Cada grupo de callos producidos a partir de explantes de una misma planta madre cultivados en la misma concentración de regulador se

consideró una línea. Con este criterio, fue posible obtener 96 líneas de callos diferentes, que fueron subcultivadas en el medio basal complementado con 0, 50 o 100 % de la concentración de Picloram o TDZ, de acuerdo con el regulador y concentración utilizados en la inducción inicial (Cuadro 1). Después de ocho semanas de cultivo en oscuridad a 25 ± 3 C se evaluó la presencia de callos que mostraron proliferaciones celulares formadas por masas translucidas compuestas por células elongadas (células embriogénicas) en cada uno de los medios, al observarlas al estereoscopio. Los embriones producidos en cada uno de estos tratamientos fueron separados de los callos y mantenidos en el medio basal sin reguladores de crecimiento.

Cuadro 1. Concentración de los reguladores de crecimiento ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) y 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (TDZ) evaluadas en el medio basal para la proliferación de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides*.

Tratamiento	Regulador de crecimiento (μ M)			
	Picloram		TDZ	
	Inducción	Proliferación	Inducción	Proliferación
Medio basal + 0% Regulador de crecimiento	4.14	0.00	4.54	0.00
Medio basal + 50% Regulador de crecimiento	4.14	2.07	4.54	2.27
Medio basal + 100% Regulador de crecimiento	4.14	4.14	4.54	4.54

Diseño experimental

Los experimentos fueron evaluados en un diseño en bloques completos al azar. La variabilidad de estos datos fue analizada mediante un modelo lineal general con distribución binomial y una función de enlace logit. Los factores estudiados en este ensayo fueron el tipo de regulador utilizado en la inducción como bloque (picloram y tidiazuron), el origen o la línea de callo establecida en la inducción (factor categórico, 96 líneas) y la concentración de regulador de crecimiento utilizada para la proliferación (factor numérico, 3 niveles= 0, 50 y 100 %). Las variables analizadas fueron porcentaje de explantes que produjeron tejidos embriogénicos, porcentaje de explantes oxidados

(tejidos con coloración oscura o necróticos), porcentaje de explantes hiperhidratados (tejidos con apariencia vidriosa debido a un contenido de agua intracelular excesivamente alto) y porcentaje de callos en crecimiento. La producción de masas proembriogénicas fue la de mayor interés, por lo que se modeló esta variable en respuesta a los factores evaluados. Los modelos fueron comparados mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC) y se consideraron factores significativos en la respuesta aquellos con $p < 0.05$. Las medias de la producción de masas proembriogénicas fueron comparadas por el método de Tukey HSD (*Honest Significant Differences*). Las medianas de oxidación, hiperhidratación y crecimiento de callos fueron comparadas gráficamente según las recomendaciones de Chambers et al. (1983), de manera que, al estimar el tamaño del efecto en un gráfico de cajas, si las hendiduras dibujadas en dos gráficos no se traslapan existe suficiente evidencia estadística para afirmar que las medianas de dichos grupos son diferentes.

Análisis de los callos por microscopía electrónica de barrido

Muestras de los callos inducidos en los tratamientos fueron procesadas para su caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para este análisis, los tejidos fueron incubados en la disolución de Karnovsky compuesta por 2.5 % (v/v) glutaraldehído y 2 % (v/v) paraformaldehído disueltos en buffer Sorensen 0.1 M (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7.4) durante 48 h a 4 C. La solución de Karnovsky fue retirada y los tejidos fueron lavados tres veces con buffer Sorensen por 10 min cada lavado. Seguido a esto los tejidos fueron sometidos a un proceso de post fijación con 2 % (m/v) tetraóxido de osmio (OsO_4) disuelto en buffer Sorensen por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada por 10 min cada uno y se realizó una deshidratación por incubación en concentraciones crecientes de etanol al 30, 50, 70, 80, 90, 95 % por 15 min cada una y tres incubaciones finales en etanol al 100% por 20 min cada una. Después de la deshidratación, se realizó un procedimiento de secado en punto crítico utilizando CO_2 en el equipo Leica CPD300. Después del secado, las muestras fueron recubiertas con partículas de oro en un cobertor iónico EMS 150R ES. Las muestras recubiertas fueron analizadas y se obtuvieron micrografías en un microscopio electrónico de barrido Hitachi TM-3000 a 7.5 kV.

Resultados

Establecimiento *in vitro*

En el presente estudio, se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación en desinfectantes para establecer los cultivos asépticos. Se observó que la cantidad de explantes asépticos y la necrosis de estos fue afectada únicamente por el factor de tiempo de incubación en NaOCl (Figura 2). En este ensayo, se determinó que el tratamiento en 1% (v/v) NaOCl por 20 min y 0.5% (v/v) H₂O₂ por 3 min fue el que presentó la mayor cantidad de explantes asépticos y la menor cantidad de explantes necróticos, mientras que el tratamiento en 1% (v/v) NaOCl por 10 min y 0.5% (v/v) en H₂O₂ presentó la mayor cantidad de explantes contaminados (Figura 2). Por su parte, el tratamiento en 2% (v/v) NaOCl por 20 min y 1% (v/v) H₂O₂ por 3 min presentó pocos explantes contaminados, pero hasta un 60% de explantes necróticos (Figura 2).

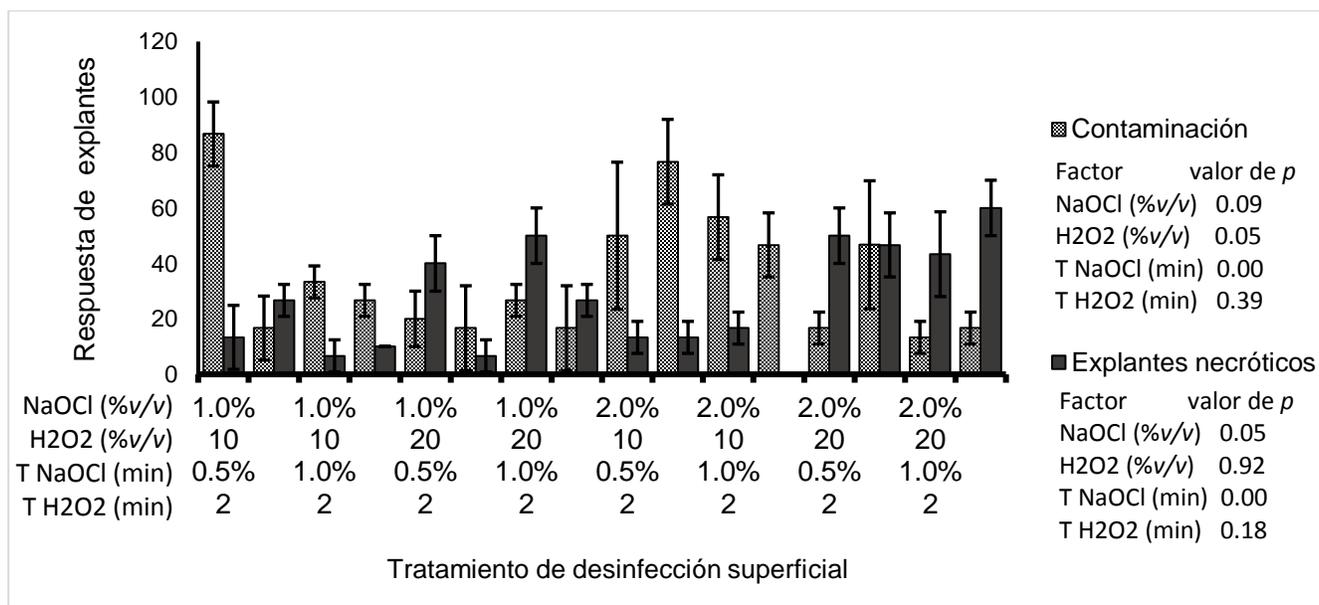


Figura 2. Proporción de explantes de *Hyeronima alchorneoides* contaminados y necrosados después de su desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y cultivo *in vitro* por dos semanas. En la figura se muestran las medias \pm desviación estándar. Los valores de *p* en cada variable de respuesta se obtuvieron por medio de un modelo lineal general con un $\alpha \leq 0.05$.

Inducción de la embriogénesis somática

Inducción de callo

Al evaluar el tipo de regulador de crecimiento en la inducción de callos embriogénicos, se observó que este factor tuvo efecto significativo en todas las variables de respuesta analizadas (Figura 3). Se determinó que el cultivo de los explantes en el medio basal sin reguladores no indujo la calogénesis, y estos explantes se necrosaron después de las ocho semanas de evaluación (Figura 3). Los explantes cultivados en presencia de 2.26 μM 2,4-D y 1.34 μM NAA permitió la calogénesis en un 20 y 87 % de los explantes respectivamente, sin embargo, en estos callos no se identificaron estructuras proembriogénicas ni embriones somáticos (Figura 3). El cultivo en 4.14 μM picloram permitió la producción de un 80% de callos a partir del total de los explantes evaluados, de los cuales un 20 % mostraron embriones somáticos y masas proembriogénicas en algunas zonas de los callos (Figura 3 y Figura 4D).

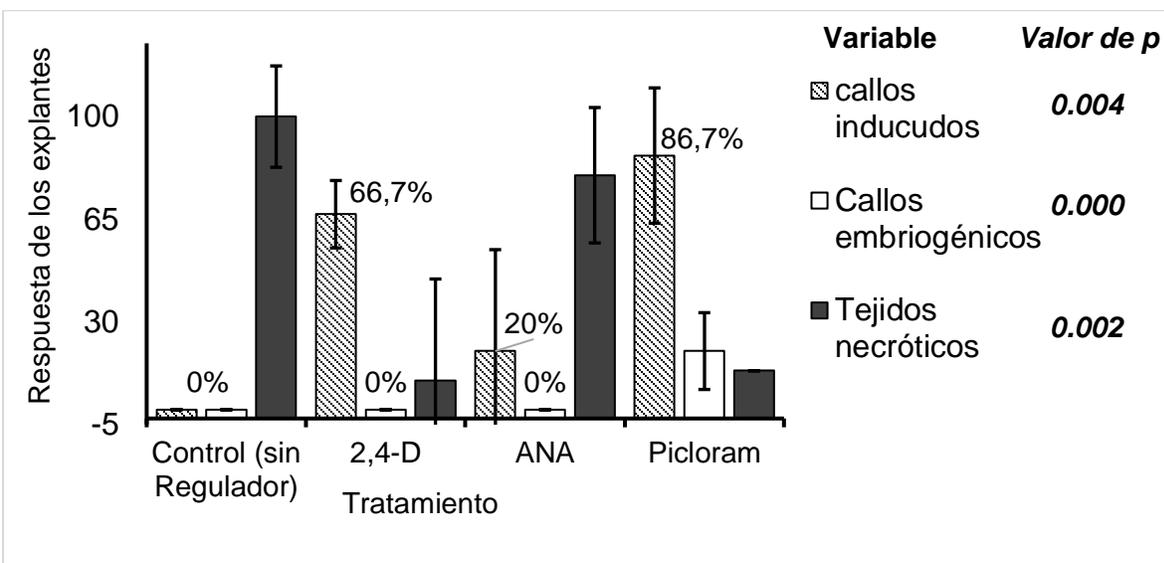


Figura 3. Respuesta de explantes de *Hyeronima alchorneoides* al cultivo *in vitro* en presencia de diferentes reguladores de crecimiento (ácido-2,4-diclorofenoxiacético, ácido naftalenacético y ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), después de ocho semanas. En la Figura 3 se muestran las medias \pm desviación estándar. Los valores de p de cada variable de respuesta se obtuvieron al analizar los datos por medio de un modelo lineal general con un $\alpha \leq 0.05$.

Todos los explantes cultivados en ausencia de reguladores de crecimiento presentaron necrosis y no se observó desarrollo de ninguna estructura a partir de estos (Figura 4A). Los explantes cultivados en presencia de 2.26 μM 2,4-D produjeron callos desarrollados a partir de los espacios intervenales del

haz de las hojas y se observó brotación de raíces a partir de estos callos (Figura 4B). Los explantes cultivados en $1.34 \mu\text{M}$ NAA permitieron el desarrollo de callos a partir de la vena central o secundaria del envés de la hoja, en estos callos no se observó el desarrollo de masas proembriogénicas ni embriones somáticos (Figura 4C). Por otro lado, a partir de los explantes cultivados en $4.14 \mu\text{M}$ picloram (Figura 4D) se produjeron callos a partir del espacio intervenal del haz de la hoja, y en algunos de estos se observó el desarrollo de embriones somáticos en regiones con células de apariencia alargada y translúcidas (Figura 4D).

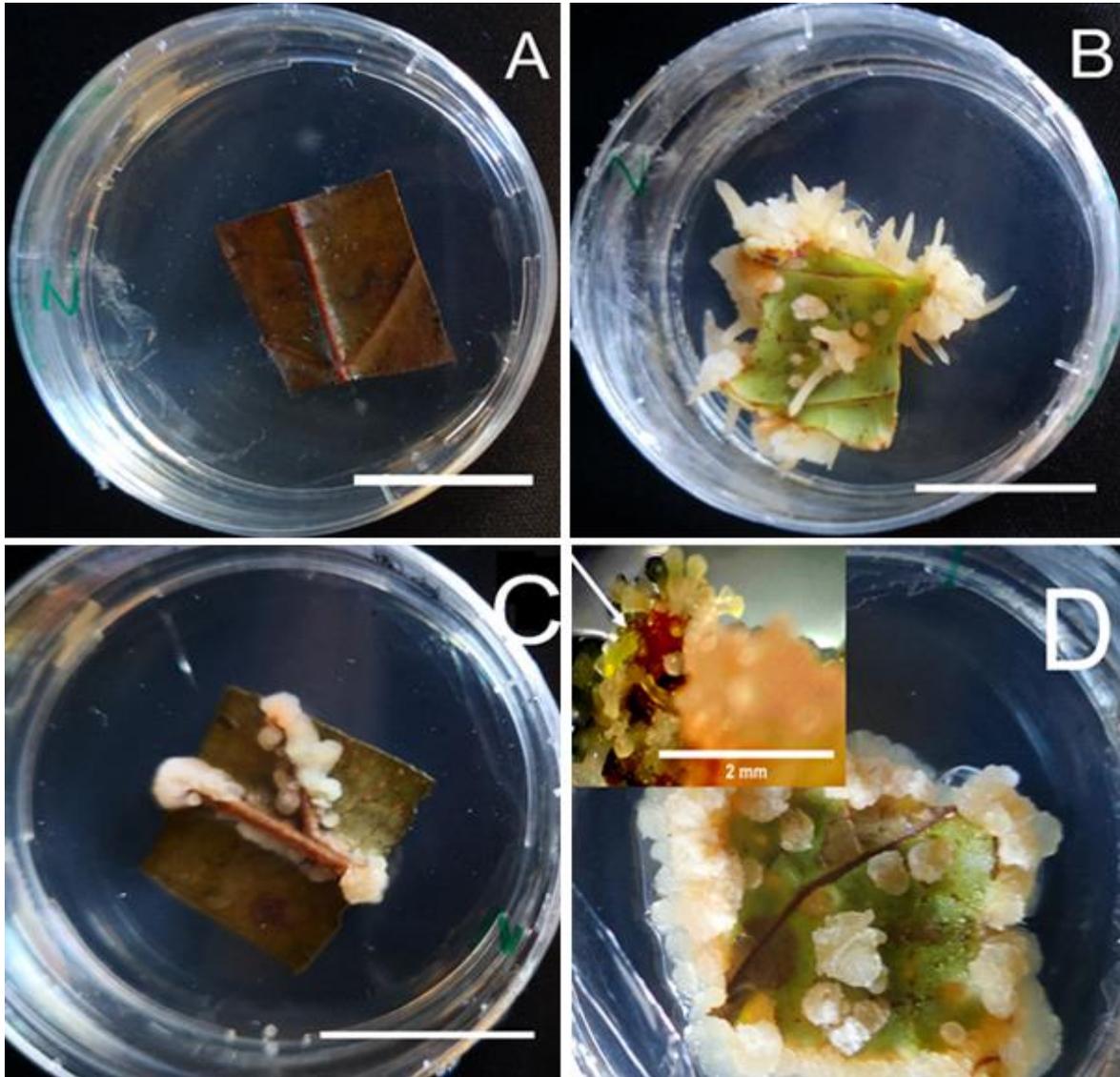


Figura 4. Inducción de callo en explantes de *Hyeronima alchorneoides* cultivados por ocho semanas en oscuridad en el medio de inducción de callo basal complementado con (A) Control sin reguladores, (B) $2.26 \mu\text{M}$ 2,4-D, (C) $1.34 \mu\text{M}$ NAA y (D) $4.14 \mu\text{M}$ picloram. En el recuadro en (D) se muestran los embriones somáticos observados en el estereoscopio. Barra de escala: A-C = 2 cm; D = 2 mm.

Proliferación del callo embriogénico

Análisis de la respuesta de producción de masas proembriogénicas por Modelo Lineal General

En la etapa de proliferación del callo proembriogénico, el efecto de los factores evaluados en la producción de masas proembriogénicas fue determinado mediante ajustes de modelo lineal general (Cuadro 2). En todos los modelos analizados se observó que el factor “línea” no aportó un efecto significativo en la variabilidad de la respuesta, ni de forma individual ni como factor cruzado (Cuadro 2). Los factores “tipo de PGR” y “Concentración de PGR” aportaron efectos significativos en todos los modelos, sin embargo, se determinó que no existe significancia de estos cuando se analizaron como factores cruzados (Cuadro 2), lo cual se considera suficiente evidencia estadística para afirmar que la interacción de estos factores no produce cambios relevantes en la variabilidad de la respuesta embriogénica. El valor de criterio de información de Akaike (AIC) sugiere que no existe suficiente evidencia estadística para aumentar la cantidad de factores en el modelo, se observó un mayor ajuste de los modelos que incluyeron cada factor por separado para explicar la variabilidad en la producción de masas proembriogénicas, que los que tomaron en cuenta factores cruzados (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del tipo de regulador de crecimiento (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea y ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), la línea y la concentración del regulador (medio sin reguladores, medio con 50% o 100% de regulador con respecto a la usada en la inducción) en el medio de proliferación, analizados como predictores en la respuesta de producción de masas proembriogénicas (PEM) en callos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados durante 8 semanas en oscuridad a 25 ± 3 C. Este análisis se realizó mediante diferentes ajustes de modelo lineal general con una función de enlace logit.

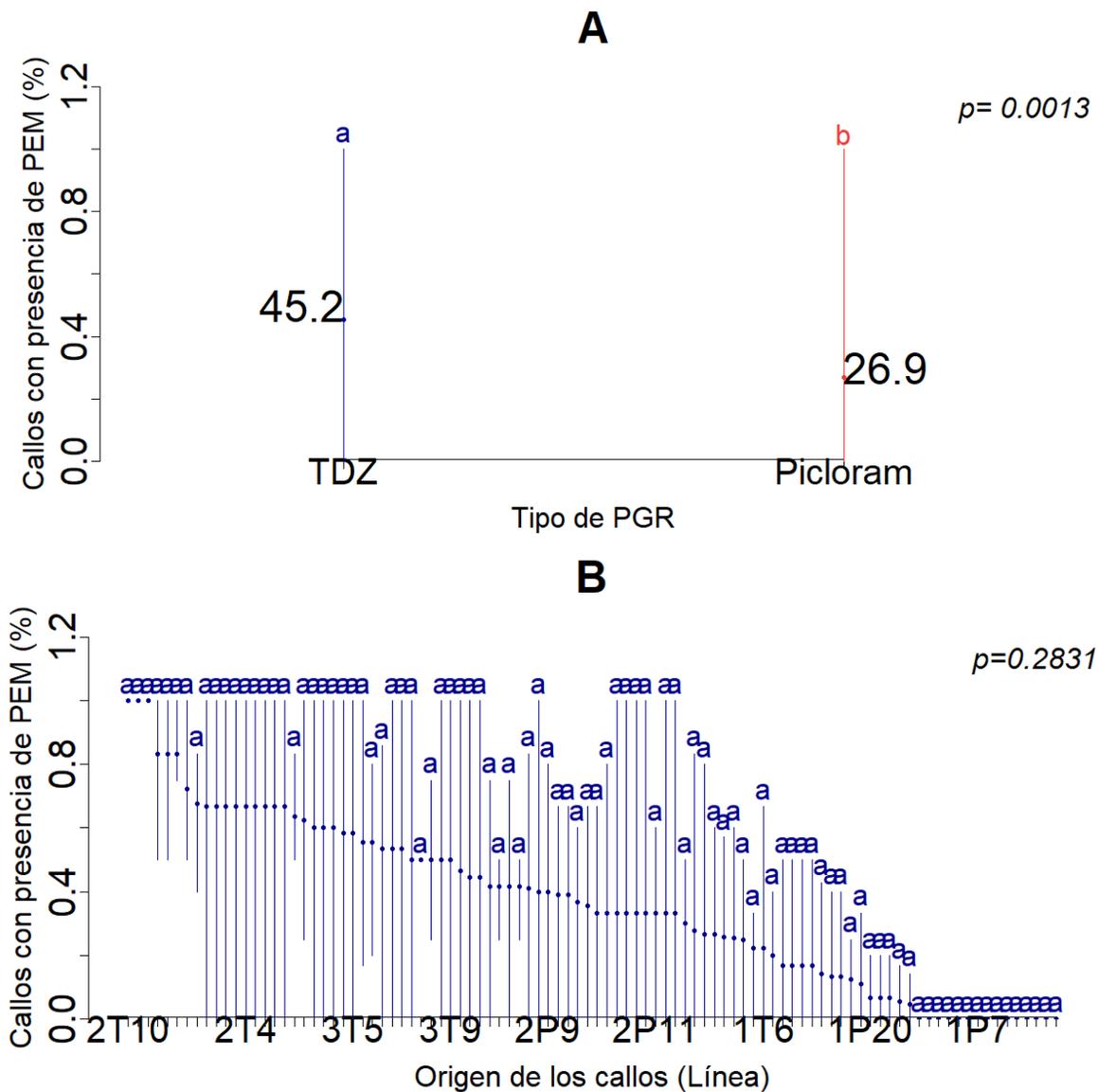
Predictores en el GLM	Tipo de predictor	Niveles	AIC	p-value
Tipo de PGR	Categorico	- TDZ - Picloram	349.51	0.0014
Línea (origen)	Categorico	- 96 niveles	435.19	0.2831
Concentración de PGR en la proliferación	Numérico	- 0% - 50% - 100%	319.61	5.472×10^{-9}
Tipo de PGR*Línea	categorico	- TDZ - Picloram	435.19	0.0014

		- 96 líneas		0.5330
		- Factor cruzado		1.0000
Tipo de PGR + Línea	Categoricos	- TDZ		0.0014
		- Picloram	435.19	
		- 96. Líneas		0.5340
Tipo de PGR*Concentració n de PGR en la proliferación	Categorico*Numéric o	- TDZ		0.0014
		- Picloram		
		- 0%	315.04	2.13x10 ⁻⁹
		- 50%		
		- 100%		
		- Factor cruzado		0.8239
Tipo de PGR*Línea*Conce ntración de PGR en la proliferación	Categorico*Categoríc o*Numérico	- TDZ		0.0014
		- Picloram		
		- 0%		2.13x10 ⁻⁹
		- 50%	7336.2	
		- 100%		0.1494
		- 96 líneas		0.1495 < p ≤
		- 4 factores cruzados		1.0000

Comparación de medias de la producción de masas proembriogénicas

En esta investigación se determinó que la inducción y proliferación de los callos en presencia de tidiazuron produjeron un 45 % de tejidos con presencia de masas proembriogénicas y este valor fue significativamente mayor que el obtenido en la inducción en presencia de picloram (Figura 5A). Asimismo, se determinó que la cantidad de callos embriogénicos producidos no varió significativamente al comparar las medias con respecto a la línea de origen del tejido, lo cual se consideró suficiente evidencia estadística para afirmar que no existe un efecto significativo aportado por el origen genético en esta variable de respuesta, el valor de $p = 0.2831$ es mayor al valor crítico de 0.05 (Figura 5B). Al analizar el efecto de la concentración de PGR en la proliferación se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en este factor, particularmente, al subcultivar los callos inducidos en un medio sin reguladores de crecimiento permitió la expresión de un 13.1 % de tejidos embriogénicos del total evaluado (Figura 5C). Las concentraciones de 50 y 100 %, es decir, el subcultivo en un medio de proliferación con la mitad o la totalidad de regulador

con respecto al usado en la inducción permitió la producción de cerca de un 50% de tejidos con masas proembriónicas, y estos tratamientos fueron significativamente mayores que los tratamientos con 0% de regulador (Figura 5C).



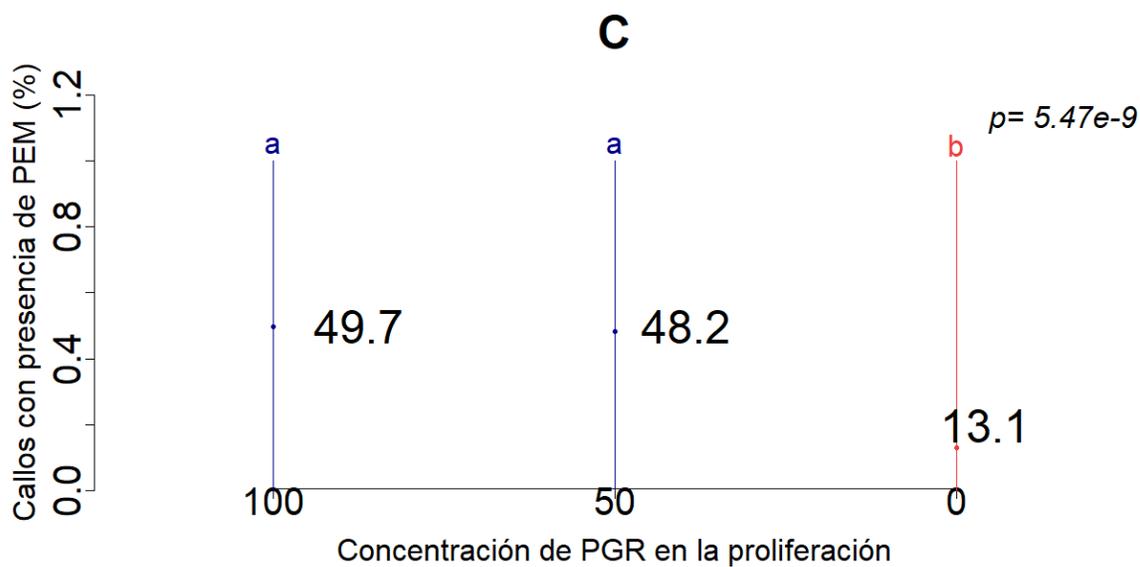


Figura 5. Efecto de los tratamientos de proliferación en la proporción de callos de *Hyeronima alchorneoides* con presencia de masas proembriogénicas (PEM). Los factores estudiados fueron: (A) Tipo de regulador de crecimiento, (B) Línea de origen del callo y (C) Concentración del regulador utilizada en la proliferación con respecto a la utilizada en la inducción. En los gráficos se muestra la significancia de cada factor obtenida de los análisis por modelo lineal general. El método de comparación utilizado fue el de Tukey con un valor crítico de $p < 0.05$. Las medias de los tratamientos que presentaron letras en común en cada factor no fueron significativamente diferentes.

Comparación de las medianas de las variables de respuesta a los tratamientos con reguladores de crecimiento

Al analizar la relación entre las variables de respuesta con los tratamientos evaluados, se observó que la mediana del porcentaje de callos que presentaron masas proembriogénicas en los tratamientos con picloram fue significativamente menor que la de los callos de los tratamientos en tidiazuron (Figura 6A). En este análisis también se observó que comparando los niveles del factor de concentración de regulador en la proliferación, la mediana de porcentaje de callos embriogénicos en el tratamiento 0% fue de 0, y fue significativamente menor que la mediana de los tratamientos en las concentraciones de 50% y 100% (Figura 6E). Se observó una mediana de tejidos necróticos significativamente mayor en el regulador picloram que en tidiazuron (Figura 6B) y también la mediana de tejidos necróticos fue significativamente menor al subcultivar en 0% del regulador en la proliferación (Figura 6F). Las medianas del porcentaje de tejidos hiperhidratados fueron bajas y estas medianas no presentaron

diferencias significativas en ninguno de los tratamientos del factor tipo de regulador de crecimiento (Figura 6C). Las medianas del porcentaje de tejidos hiperhidratados tampoco presentaron diferencias significativas en respuesta a la concentración de regulador utilizada en la proliferación, aunque se observó una dispersión de datos notablemente menor en el tratamiento de 0% de regulador de crecimiento (Figura 6G). En este análisis se determinó que en la etapa de proliferación se obtuvieron porcentajes de callos en crecimiento con medianas estadísticamente equivalentes en respuesta al tipo de regulador de crecimiento, aunque los datos de TDZ presentaron menor dispersión que los de picloram (Figura 6D). En este ensayo se observó que una concentración de regulador de 50% o más permitió una mediana de callos en crecimiento de 100% (Figura 6H).

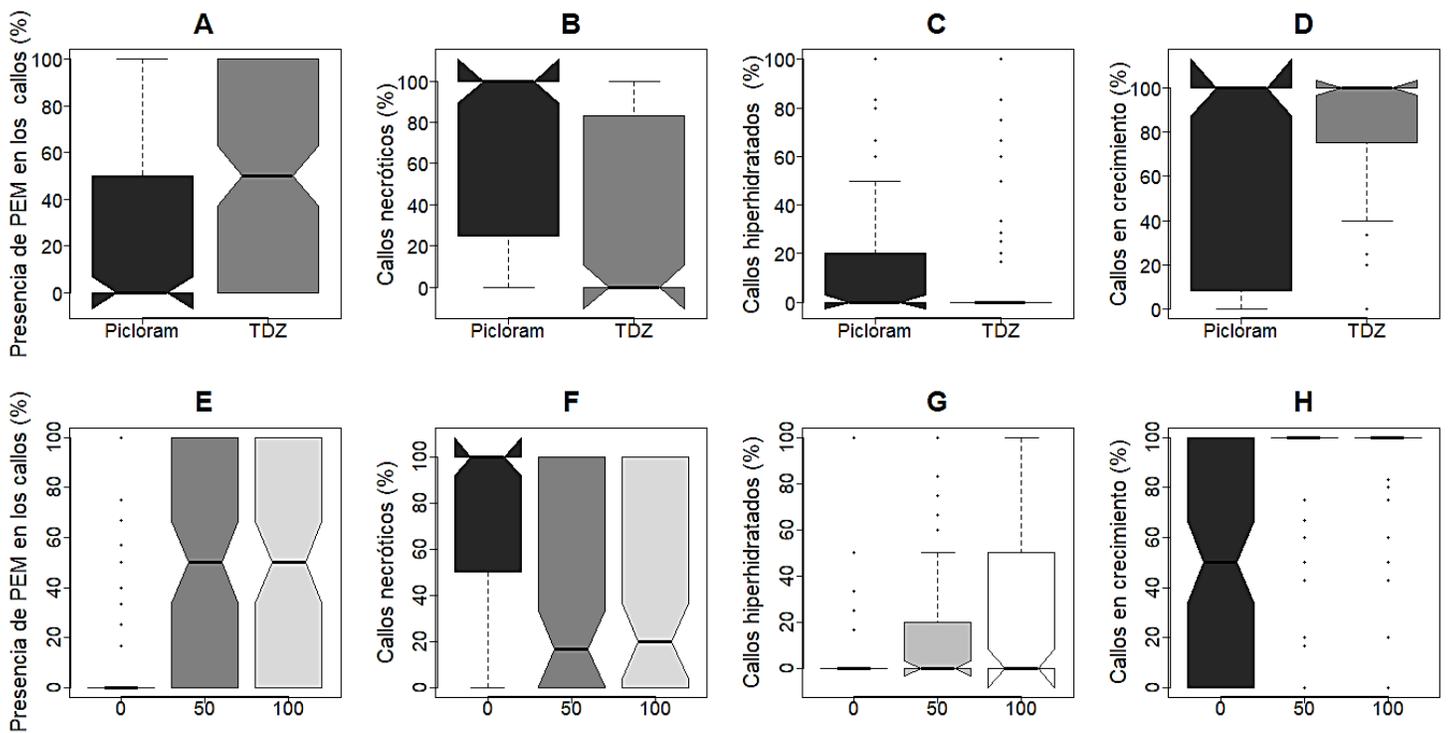


Figura 6. Respuesta de los callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* a los tratamientos de proliferación evaluados. Gráficos de cajas (A-D) corresponden a la relación entre el factor “tipo de PGR” y las medianas del porcentaje de tejidos que presentaron las variables de respuesta. (A) presencia de masas proembriogénicas. (B) callos necróticos. (C) callos hiperhidratados. (D) callos en crecimiento. Gráficos de cajas (E-H) corresponden a la relación entre los niveles del factor “Concentración de PGR” utilizada en la proliferación y las medianas variables de respuesta. (E) presencia de masas proembriogénicas. (F) callos necróticos. (G) callos hiperhidratados. (H) callos en crecimiento. Evaluación realizada después de 8 semanas de cultivo en oscuridad en cada uno de los

tratamientos. Si las hendiduras de dos cajas no se traslapan existe suficiente evidencia estadística para afirmar que las dos medianas son significativamente diferentes, con una significancia de 0.05.

En la etapa de proliferación, los callos cultivados en los tratamientos con picloram presentaron una apariencia más uniforme con segmentos de callo embriogénico de mayor tamaño comparado con los callos cultivados en tiazuron durante la misma etapa (Figura 7A y 7B). Los callos en los tratamientos con tiazuron presentaron segmentos embriogénicos y no embriogénicos mezclados en superficies menores, por lo que fueron tejidos con apariencia más heterogénea (Figura 7B). Los tratamientos de proliferación permitieron la producción de embriones somáticos en los dos reguladores evaluados, observándose diferentes estadios de desarrollo, particularmente se identificaron los estadios globular y torpedo en los varios de los tratamientos con picloram (Figura 7A) y globulares en algunos de los tratamientos con tiazuron (Figura 7B). Los embriones que proliferaron en picloram mostraron un desarrollo mayor para el periodo de evaluación que los que proliferaron en tiazuron (Figura 7C y Figura 7D). Varios de los embriones de los tratamientos de picloram se encuentran germinando, y presentaron bipolaridad con un eje radical y un eje caulinar (Figura 7C). Por su parte, los embriones de los tratamientos con tiazuron mostraron un menor desarrollo, se observaron únicamente en el estadio globular durante el periodo de evaluación (Figura 7D).

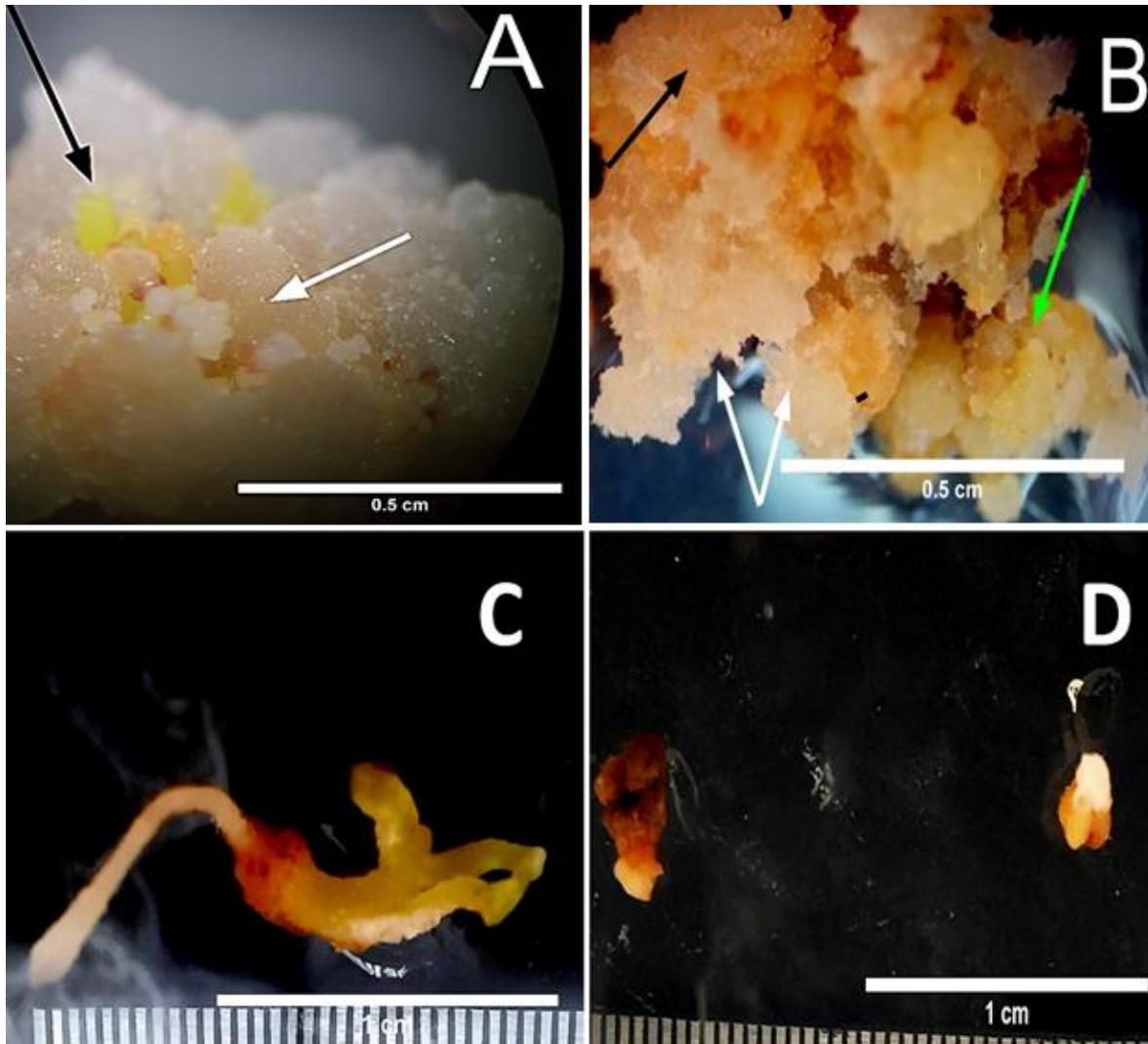


Figura 7. Respuesta de los callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados en los tratamientos de proliferación. (A) Callos inducidos en $12.42 \mu\text{M}$ picloram y subcultivados en 50% de este regulador para inducir su proliferación. (B) Callos inducidos en $6.81 \mu\text{M}$ tidiazuron y subcultivados en 100% de este regulador para inducir su proliferación. (C) Embrión somático en germinación producido a partir de callo inducido en $4.14 \mu\text{M}$ picloram y subcultivado en $2.07 \mu\text{M}$ picloram durante la proliferación. (D) Embriones somáticos en estadio globular producidos a partir de callo inducido en $9.08 \mu\text{M}$ tidiazuron y subcultivado en la misma concentración durante la proliferación. Flecha negra en A señala embriones en estadio torpedo, flecha blanca en A señala embriones en estadio globular. Flecha negra en B señala apariencia del callo no embriogénico, flechas blancas en B señalan la apariencia del callo embriogénico, flecha verde en B señala embriones en estadio globular. Barra de escala: A, B = 0.5 cm, C, D = 1 cm.

Correlación de las variables de los tratamientos de proliferación

En este análisis se determinó que el porcentaje de callos en crecimiento correlacionado con el de callos necróticos presentó un valor de $r = -0.52$, este par de variables presentaron la correlación más fuerte de todo el ensayo de proliferación (Figura 8). El porcentaje de callos hiperhidratados correlacionado con la cantidad de regulador de crecimiento en la proliferación presentó un coeficiente $r = 0.24$, indicando una correlación significativa y directamente proporcional entre estas variables, asimismo, se observó que no existe una relación significativa entre el porcentaje de callos hiperhidratados y el porcentaje de callos que mostraron presencia de masas proembriónicas, con un $r = -0.11$ (Figura 8). También se determinó que la concentración de regulador de crecimiento en el medio de cultivo de proliferación se relacionó de forma significativa y directamente proporcional con el porcentaje de callos que presentaron masas proembriónicas y con el porcentaje de callos en crecimiento (Figura 8). Por último, se determinó que existe una correlación significativa y directamente proporcional entre el porcentaje de callos en crecimiento y el porcentaje de presencia de masas proembriónicas (Figura 8).

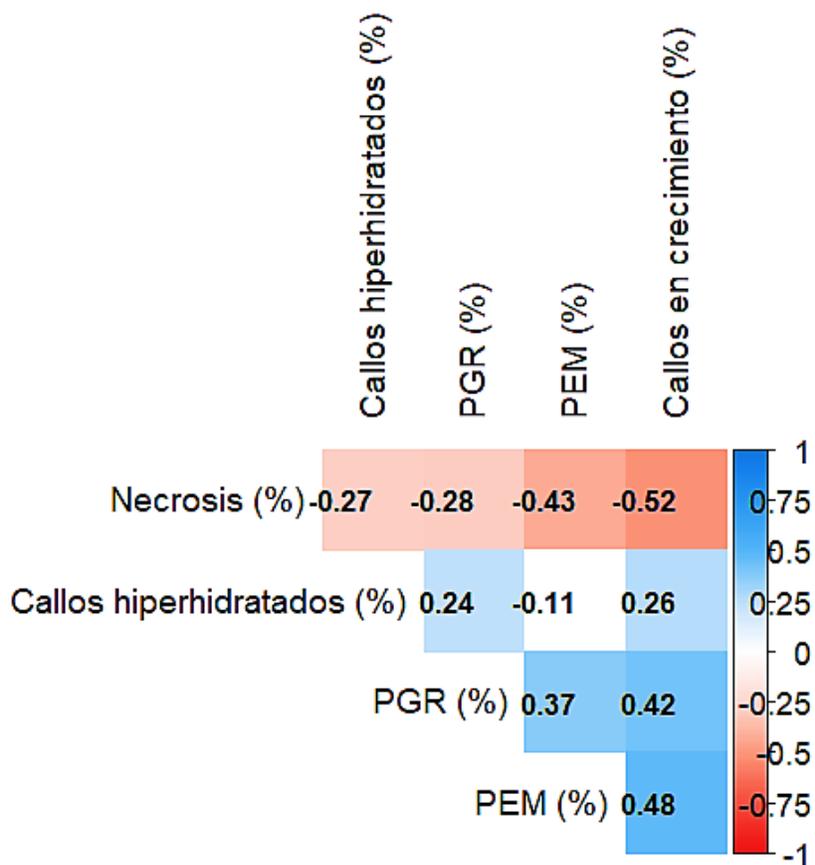


Figura 8. Correlograma de las relaciones entre las variables del experimento de proliferación de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides*. Análisis realizado con un nivel de significancia menor o igual a 0.05. La escala de color indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson para cada par de variables. Correlaciones no significativas se indican con coloración blanca en el correlograma.

Análisis de los callos por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Inducción de callo

Los callos no embriogénicos inducidos a partir del cultivo de los segmentos de hoja en presencia de 1.34 μM NAA y 2.26 μM 2,4-D mostraron la proliferación de gran cantidad de células, poco compactas entre sí y con bajo nivel de organización, anatomía característica de células en callos no embriogénicos (Figura 9A y Figura 9B). Por su parte, los callos inducidos en 4.14 μM picloram que produjeron embriones somáticos se caracterizaron por ser estructuras granulares compactas, y se observaron divisiones celulares anticlinales asimétricas (Figura 9C), estos callos embriogénicos iniciaron su proliferación a partir de células epidérmicas que formaron centros meristemáticos (MC), caracterizados por ser clúster con alta tasa de división celular (Figura 9D).

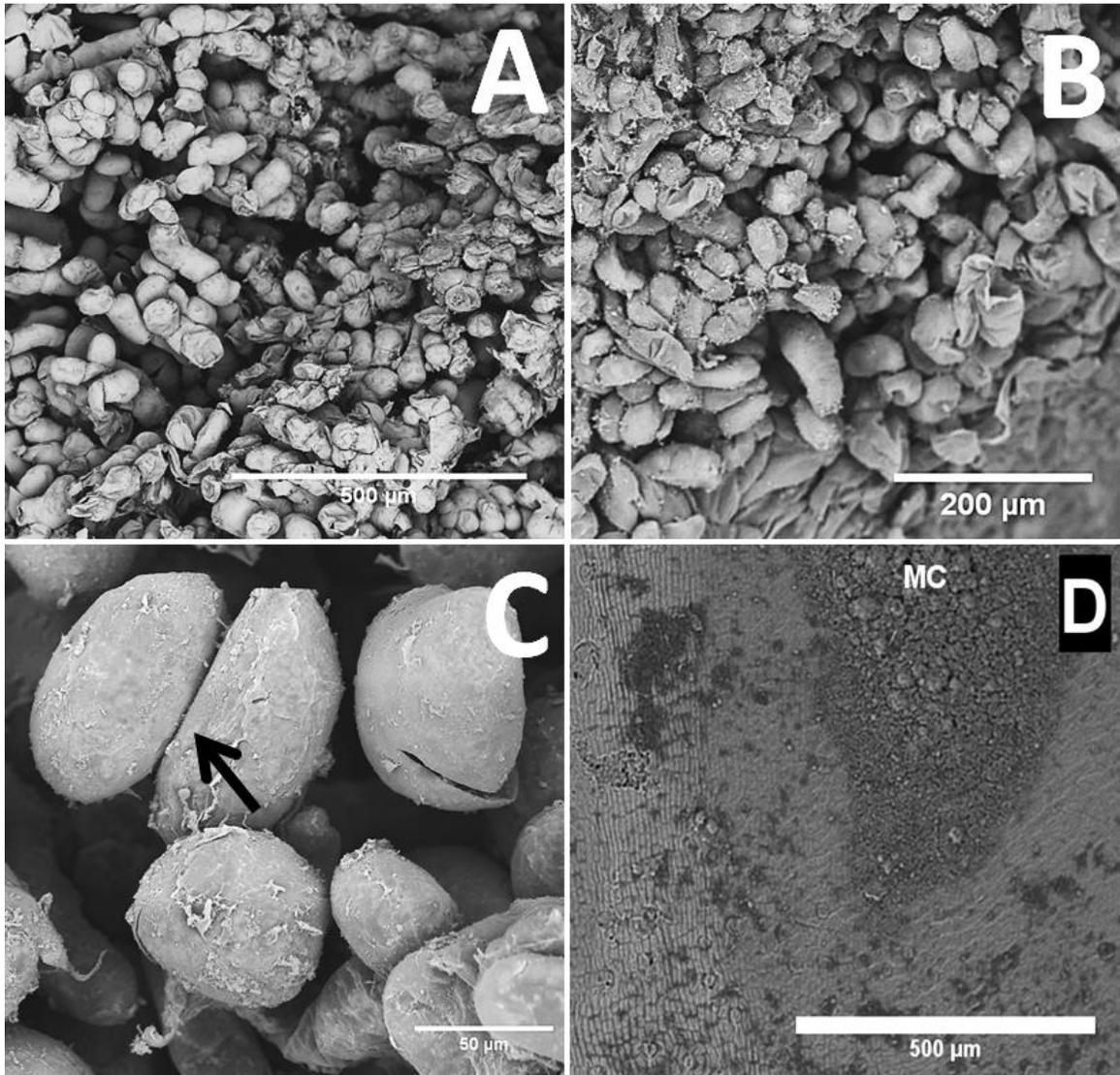


Figura 9. Micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de los callos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados en el medio de inducción por 8 semanas. (A) Callo inducido en 1.34 μM NAA (ácido naftalenacético). (B) Callo inducido en 2.26 μM 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético). (C) Células en división celular asimétrica del callo inducido en 4.14 μM picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico). (D) Tejido epidérmico iniciando la formación de callo, se observa una región con un centro meristemático (MC). La flecha negra en C señala una diada producida por una división celular anticlinal. Barra de escala: A = 500 μm ; B = 200 μm ; C = 50 μm ; D = 500 μm .

Proliferación de callo embriogénico

El análisis de microscopía electrónica de barrido permitió determinar la morfología de los callos y el estadio de los embriones somáticos en la etapa de proliferación (Figura 10). Los callos embriogénicos inducidos en 8.28 μM picloram y subcultivados en un medio sin reguladores de crecimiento durante la proliferación (Figura 10A) y los callos embriogénicos inducidos en 4.54 μM tidiazuron y subcultivados en la misma concentración de regulador en la etapa de proliferación (Figura 10B) mostraron una superficie compacta, con células alargadas a partir de las cuales fue posible observar el desarrollo de embriones somáticos. Los embriones en estadio torpedo presentaron un ápice caulinar característico y un tamaño aproximado de 2 mm y se desarrollaron a partir de segmentos de callo embriogénico (EC) compactos y con células alargadas (Figura 10C). Los embriones somáticos en estadio globular se desarrollaron a partir de los márgenes del callo embriogénico y se observó una cobertura con una capa fibrilar compacta de material extracelular (ECM) (Figura 10 D). Esta cobertura con material extracelular fue discontinua en algunas regiones, conectando la mayoría embriones globulares y células proembriogénicas (Figura 10D). Esta capa desapareció en estadios más avanzados como torpedo, en favor de la diferenciación de la protodermis (Figura 10C).

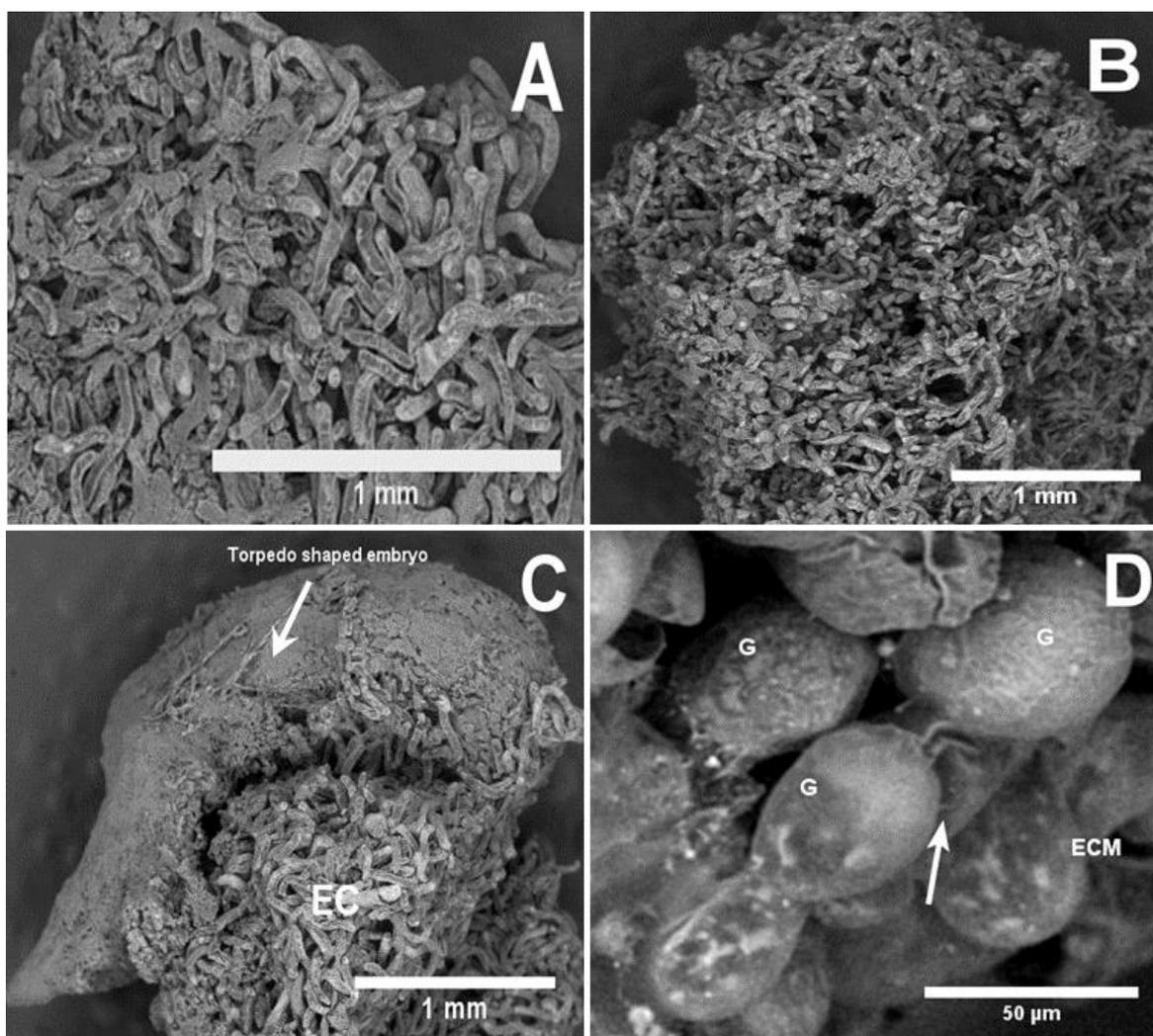


Figura 10. Embriogenesis somática de *Hyeronima alchorneoides* observada en el microscopio electrónico de escaneo después del cultivo en el medio de proliferación por 8 semanas. (A) Apariencia del callo embriogénico inducido en $8.28 \mu\text{M}$ picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y subcultivado en ausencia de reguladores durante la proliferación. (B) Apariencia de la superficie del callo embriogénico inducido en $4.54 \mu\text{M}$ tiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiazol-5-il)urea) y subcultivado en la misma concentración de regulador (100%) en la etapa de proliferación. (C) Vista detallada de embrión somático en estadio de torpedo producido a partir de callo embriogénico inducido en $8.28 \mu\text{M}$ picloram y subcultivado en $0 \mu\text{M}$ picloram por 8 semanas. (D) Vista detallada de embriones somáticos globulares formados a partir del callo embriogénico inducido y subcultivado en $4.54 \mu\text{M}$ tiazuron en la etapa de proliferación. Nótese la presencia de material extracelular (ECM) membranoso cubriendo algunos de los embriones somáticos (flecha blanca). Barra de escala: A-C= 1 mm; D = $50 \mu\text{m}$.

Discusión

La embriogénesis somática es un proceso de expresión de la totipotencia vegetal, que se utiliza como la plataforma de preferencia para la regeneración de plantas, tanto en la micropropagación como para la conservación de germoplasma y para el mejoramiento de rasgos específicos (Kaur et al., 2018; Pais 2019). Diversos estudios recomiendan esta estrategia para la propagación clonal de especies forestales de interés comercial como *Pinus* sp. (Castander-Olarrieta et al., 2020; Gao et al., 2020), *C. arabica* (Awada et al., 2020), *Betulla platyphalla* (Yang et al., 2020), *Quercus suber* (Benali & Lamarti, 2019), *Santallum album* (Singh et al., 2016), así como para la conservación (Gladfelter et al., 2020), lo cual evidencia la utilidad de la técnica en estas aplicaciones.

Para inducir la embriogénesis somática *in vitro* se requiere establecer cultivos asépticos de los explantes utilizados como material de partida. En el presente estudio se desarrolló un protocolo para el establecimiento de explantes de hoja mediante la incubación en NaOCl y H₂O₂ y una combinación de Methylisothiazolone y Methylchloroisothiazolinone. Se determinó que el factor que tuvo efectos significativos en la asepsia y sobrevivencia de los explantes fue el tiempo de incubación en NaOCl (p-value = 0.00) y este resultado coincide con los obtenidos en otras investigaciones similares que señalan que es posible lograr mayor cantidad de cultivos asépticos al aumentar el tiempo de exposición de los explantes en este desinfectante (Abdelnour-Esquivel et al. 2020). Adicionalmente, el NaOCl es un desinfectante económico y fácil de conseguir por lo que es ampliamente utilizado en el establecimiento *in vitro* de diversos tipos de tejidos como semillas (Almeida et al. 2020; Hesami et al. 2019), yemas (Cardoso-Furlan et al. 2018; Thakur et al. 2018), ápices y espigas (Kaur y Sandhu 2015), entre otros. La utilización de otras sustancias biocidas en adición al hipoclorito de sodio es recomendada cuando la contaminación es persistente. En el presente estudio, los explantes desinfectados fueron sumergidos en 40% (v/v) supresor SB ARVI ® antes de ser inoculados en el medio de cultivo. La combinación de Methylisothiazolone y Methylchloroisothiazolinone es un potente biocida de amplio espectro, que inhibe el desarrollo de la contaminación por bacterias, hongos y microalgas en el medio de cultivo (Silvetti et al. 2018). Particularmente, esta combinación de moléculas afectan enzimas clave en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, previniendo la germinación de esporas y destruyendo células microbianas (Laboratorios Químicos ARVI S.A. 2015). En el establecimiento *in vitro* este desinfectante es de gran utilidad y se ha demostrado su efectividad tanto en la esterilización superficial de los explantes (Abdelnour-Esquivel et al. 2020), como adicionado al medio de cultivo para suprimir la aparición de microorganismos contaminantes (Putri et al. 2020).

Después de determinar las condiciones para el establecimiento *in vitro*, se evaluaron diferentes tratamientos para la inducción de callo. La elección del explante inicial y del regulador de crecimiento son dos factores de mayor importancia en la embriogénesis somática (Pal et al. 2012; Guan et al. 2016). Contrario al protocolo para la producción de embriones somáticos previamente reportado en *H. alchorneoides* (Valverde-Cerdas et al. 2013), en el presente estudio los explantes iniciales fueron segmentos de hoja, que al ser tejidos vegetativos se espera que mantengan las características de las plantas madre (Akram & Aftab, 2016). Asimismo, es ampliamente conocido que los embriones cigóticos de esta especie presentan varias dificultades para su uso, como lo son su respuesta recalcitrante en el almacenamiento, baja tasa de viabilidad y daños por insectos, por lo que los embriones somáticos son la opción principal a considerar para la conservación de germoplasma de *H. alchorneoides* (Abdelnour, Aguilar y Valverde 2011).

La selección del regulador de crecimiento es de una importancia equivalente a la selección del explante para el proceso de embriogénesis somática (Pal et al. 2012). El uso de auxinas sintéticas para la inducción de callo se ha reportado en especies agroforestales tropicales como dicamba en *C. odorata* (Peña-Ramírez et al., 2011), 2,4-D en *Santalum album* (Singh et al., 2016), NAA en *Tectona grandis* (Akram & Aftab, 2016) y *Leucaena* sp (Pal et al., 2012). La aplicación exógena de auxinas induce una respuesta embriogénica, que es asociada con un incremento de la actividad de genes de biosíntesis de IAA como los genes TAA1 y YUCs (Méndez-Hernández et al. 2019). Al mismo tiempo, son activados los genes de transporte PIN que causan una acumulación diferencial del IAA en los proembriones desarrollados, lo cual tiene un efecto en el desarrollo de los estadios del embrión somático hasta la formación de la nueva plántula (Méndez-Hernández et al. 2019).

En la presente investigación se determinó que al comparar el cultivo de los explantes en picloram, 2,4-D y NAA, el primer regulador fue el único que indujo respuesta embriogénica en segmentos de hoja de *Hyeronima alchorneoides*, por lo cual este regulador fue seleccionado para el ensayo de proliferación. La efectividad de concentraciones moderadas de picloram en la inducción de la embriogénesis somática ha sido comprobada en recientes investigaciones con resultados similares a los obtenidos en la presente investigación Chib et al. (2020) indujeron embriogénesis somática al cultivar cormos de *Crocus sativus*, Silveira et al. (2020) en segmentos de hoja de *Plinia peruviana*, Almeida et al. (2020) en explantes de hoja de *E. guianensis*, entre otras especies.

Generalmente, la obtención de los embriones somáticos ocurre en varias etapas de inducción, que varían dependiendo de las especies y de condiciones fisiológicas todavía desconocidas (Corredoira et al., 2019). Después de obtener el callo embriogénico se requiere la proliferación de las estructuras y lograr el desarrollo de los embriones (Guerra et al., 2016). En el presente estudio se analizó el efecto

de la auxina sintética ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) y el derivado de la fenilurea el 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (tidiazuron o TDZ) en la proliferación de masas proembriónicas en los callos inducidos con estos reguladores de crecimiento. El picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) ha sido utilizado comúnmente como herbicida, sin embargo, se han reportado sus efectos positivos en la inducción de callos para la producción de metabolitos (Genady 2017), la organogénesis en combinación con citocininas (Gladfelter et al. 2020) y en la inducción de embriogénesis somática indirecta *in vitro* (Dai et al., 2015).

Los resultados del presente estudio fueron contrarios a los obtenidos en la embriogénesis somática de *Stewartia* sp. (Gladfelter et al., 2020). Estos autores encontraron una alta significancia relacionada con el origen genético de los tejidos en la embriogénesis somática, así como un mayor porcentaje de explantes con respuesta embriónica al subcultivar los callos en un medio sin picloram, mientras que en la presente investigación, la línea de origen del tejido no tuvo un efecto significativo en la respuesta de los callos, y el subcultivo en el medio de proliferación sin picloram produjo menor porcentaje de callos con masas proembriónicas.

Por otra parte, el tidiazuron es un regulador tradicionalmente usado en la agroindustria como un defoliante (Dinani et al., 2018). Comparado con otros reguladores del crecimiento, tidiazuron es de los más potentes y exhibe efectos en las plantas tanto de auxina como de citocinina, lo que explica su amplia versatilidad en aplicaciones *in vitro* e *in vivo* incluyendo la prevención de la degradación de la clorofila, aumento en la actividad fotosintética, finaliza la latencia de yemas, maduración de frutos, así como la proliferación de brotes adventicios, inducción de callo e inducción y proliferación de la embriogénesis somática (Dinani et al. 2018). Al comparar el tidiazuron con otras citocininas, se reporta que este regulador causa una alteración en el desarrollo de células meristemáticas de forma más dirigida, además al ser resistente a la citocinina oxidasa lo convierte en un compuesto estable en el cultivo de tejidos (Pal et al., 2012).

En el presente estudio, el tidiazuron mostró el potencial esperado en la inducción de embriogénesis somática, ya que se determinó que el cultivo de los explantes en este regulador permitió una respuesta embriónica significativamente mayor al cultivo en picloram. Resultados similares utilizando este regulador se obtuvieron en la inducción de la embriogénesis somática en *Pelargonium sidoides* (Kumar et al., 2015), *Tectona grandis* (Akram & Aftab, 2016) y *Capsicum annum* (Khan et al., 2006), así como resultados contrarios a los reportados por Liang et al. (2020) en *Scaevola taccada* quienes encontraron que los tratamientos con tidiazuron mostraron poca efectividad.

En el estudio realizado por Valverde-Cerdas et al. (2013) fue posible la obtención de embriones somáticos en *Hyeronima alchorneoides* a partir de embriones cigóticos como explante. El presente es el primer reporte de inducción de embriones somáticos con picloram y TDZ no solo en *Hyeronima alchorneoides*, sino en la familia phyllantaceae utilizando segmentos de hoja como explantes de partida, lo cual representa un gran avance para la propagación y conservación de genotipos específicos de interés para el sector forestal. Esto fue confirmado por la visualización de los callos embriogénicos en el estereoscopio y el microscopio electrónico de barrido.

En el presente estudio fue posible visualizar divisiones celulares anticlinales, lo cual evidencia el crecimiento de células competentes a la embriogénesis somática para la formación de las masas proembriogénicas como lo indicado en otras especies como *A. sativa* (Borji et al., 2018). Asimismo, el análisis en SEM permitió identificar algunos cambios durante la adquisición de la capacidad embriogénica y el desarrollo de los embriones en *Hyeronima alchorneoides*. Fue posible observar células con capacidad y predisposición para la formación de embriones somáticos de forma indirecta. Los centros meristemáticos se desarrollaron a partir de células competentes en los explantes de hojas, y se han reportado presencia de células con competencia embriogénica en diferentes tejidos de las plantas como raíces, hojas y entrenudos (Liang et al., 2020). Los centros meristemáticos poseen características particulares como son alta tasa de división celular, anatomía isodiamétrica, núcleos densos, abundantes gránulos de almidón entre otras, características observadas durante la embriogénesis somática en otras especies como *P. sidoides* (Kumar et al., 2015) y *E. guianensis* (Almeida et al., 2020), entre otros.

Otra evidencia ultraestructural de la embriogénesis somática es la presencia de cúmulos celulares (estructuras proembriogénicas) en los callos cubiertos con materiales fibrilares extracelulares, que en estadios posteriores al globular puede originar la protodermis del embrión (Borji et al. 2018). En el presente estudio se identificó la cobertura de los embriones globulares con este tipo de material y estos resultados coinciden con los reportados por diversos estudios, donde se indica la presencia de la protodermis como una evidencia de un correcto desarrollo de los embriones somáticos (Kaur et al., 2018; Peña-Ramírez et al., 2011).

Asimismo, una vez separados del callo y cultivados en un medio sin reguladores se pudo observar el desarrollo de las plántulas con una estructura bipolar característica con un eje radical y un eje caular. Este comportamiento en el desarrollo de las plántulas es comúnmente alcanzado después de la maduración de los embriones somáticos, y es de vital importancia en la sobrevivencia de las plantas producidas mediante esta metodología. Se reporta desarrollo de los embriones somáticos en plántulas

con estructura bipolar en diversas especies como *Ormosia henryi* (Wu et al., 2020), *Neolamarkia Cadamba* (Huang et al., 2020), *Tectona grandis* (Akram & Aftab, 2016), entre otras.

Conclusiones

En el presente estudio se desarrolló un protocolo eficiente para la producción de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides in vitro*, una especie forestal de conocido interés para el sector en Costa Rica y Centroamérica. Este es el primer reporte en el que se obtiene la embriogénesis somática en una especie de la familia Phyllanthaceae utilizando picloram y tidiazuron en el cultivo de explantes de hoja, lo cual representa un avance importante para la reproducción de la especie en el laboratorio, que puede utilizarse para la propagación masiva de genotipos de interés, la renovación de los jardines clonales, el mejoramiento no convencional por técnicas como ingeniería genética o inducción de mutaciones, así como para la conservación a largo plazo de la especie en nitrógeno líquido, dada su recalcitrancia en el almacenamiento por métodos convencionales.

Se determinó que en el establecimiento la esterilización superficial de segmentos foliares en 1% (v/v) NaOCl por 20 min y 0.5% (v/v) H₂O₂ por 3 min fue el que presentó la mayor cantidad de explantes asépticos y la menor cantidad de explantes necróticos, por lo que es el tratamiento recomendado para iniciar los cultivos a partir de plantas mantenidas en invernadero. En la inducción de callo a partir del cultivo de segmentos de hoja se destaca que las auxinas 2,4-D y NAA permitieron la inducción de callos friables, con capacidad para la regeneración de tejidos radicales, principalmente el 2,4-D. Por su parte, la auxina picloram permitió la producción de callos, y algunos de estos fueron caracterizados como embriogénicos.

En la etapa de proliferación, se determinó que los factores que causaron mayor impacto en la respuesta embriogénica fueron el tipo de regulador de crecimiento utilizado en las fases de inducción y proliferación, así como el porcentaje de regulador utilizado en la proliferación, Por lo tanto, se recomienda el uso del regulador tidiazuron, en una concentración de 1, 2 o 3 mg.L⁻¹ para la inducción de callo y el subcultivo en la misma concentración o reducido a la mitad, puesto que no se encontraron diferencias significativas en esta etapa del proceso en la producción de masas proembriogénicas. Adicionalmente, el análisis estadístico de la respuesta embriogénica en la proliferación permitió determinar que la línea de origen de los tejidos no tuvo un impacto significativo en esta respuesta, por lo que la metodología reportada se perfila como promisoría para una mayor diversidad de genotipos.

Literatura citada

- Abdelnour, A.; Aguilar, M.; Valverde, L. (2011). Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*. 32(2).
- Abdelnour-Esquivel, A., Rojas, G., & Alfaro, U. (2007). Estudios preliminares para la criopreservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*, 20(1), 98-103.
- Abdelnour-Esquivel, A., Perez, J., Rojas, M., Vargas, W., & Gatica-Arias, A. (2020). Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(1), 88-97. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>
- Akram, M., & Aftab, F. (2016). Establishment of Embryogenic Cultures and Efficient Plant Regeneration System from Explants of Forced Softwood Shoots of Teak (*Tectona grandis* L.). *Horticultural Plant Journal*, 2(5), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.01.008>
- Almeida, R. F., Meira, F. S., Gomes, H. T., Balzon, T. A., Bartos, P. M. C., Meira, R. de O., da Cunha, R. N. V., 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>
- Almeida, S. P., Souza, J. M., Amorim, A. M., Gusmão, S. A. de, Souza, R. O., Santos, A. S., Almeida, S. P., Souza, J. M., Amorim, A. M., Gusmão, S. A. de, Souza, R. O., & Santos, A. S. (2020). In vitro culture of jambu with different growth regulators. *Horticultura Brasileira*, 38(2), 134-138. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620200204>
- Alvarado, D. (2016). *Evaluación de ensayos clonales de Hieronyma alchorneoides en la zona norte de Costa Rica*. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago.
- Awada, R., Verdier, D., Froger, S., Brulard, E., de Faria Maraschin, S., Etienne, H., & Breton, D. (2020). An innovative automated active compound screening system allows high-throughput

- optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Scientific Reports*, *10*(1), 810.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57800-6>
- Benali, N., & Lamarti, A. (2019). Secondary Somatic Embryogenesis for Cork Oak (*Quercus Suber* L.): Influence of Sugars. *2019*, *6*(1), 9.
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Delhi: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-81-322-1026-9
- Borji, M., Bouamama-Gzara, B., Chibani, F., Teyssier, C., Ammar, A. B., Mliki, A., Zekri, S., & Ghorbel, A. (2018). Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var 'Meliane'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *132*(2), 329-342. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1333-1>
- Braatz, J., Harloff, H., Mascher, M., Stein, N., Himmelbach, A., & Jung, C. (2017). CRISPR-Cas9 induced mutations in polyploid oilseed rape. *Plant Physiology*, *174*(3), 1-26. doi:10.1104/pp.17.00426
- Brancalion, P., & Chazdon, R. (2017). Beyond hectares: four principles to guide reforestation in the context of tropical forest and landscape restoration. *Restoration Ecology*, *25*(4), 491-496. doi:10.1111/rec.12519
- Cardoso-Furlan, F., Gavilan, N. H., Zichner-Zorz, A., Oliveira, L. S. de, Konzen, E. R., & Ebling-Brondani, G. (2018). Active chlorine and charcoal affect the in vitro culture of *Bambusa vulgaris*. *Bosque (Valdivia)*, *39*(1), 61-70. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002018000100061>
- Carvalho, M., Oliveira, E., Souza, A., Pereira, J., Diamantino, M., & Oliveira SAS. (2017). Cleaning cassava genotypes infected with cassava frogskin disease via in vitro shoot tip culture. *Genetic Molecular Resources*, *16*(2), 1-17. doi:10.4238/gmr16029556
- Castander-Olarrieta, A., Moncaleán, P., & Montalbán, I. A. (2020). *Pinus canariensis* plant regeneration through somatic embryogenesis. *Forest Systems*, *29*(1), eSC05. <https://doi.org/10.5424/fs/2020291-16136>

- Chambers, J. M., Cleveland, W. S., Kleiner, B. and Tukey, P. A. (1983). *Graphical Methods for Data Analysis*. Wadsworth & Brooks/Cole.
- Chemical Laboratory ARVI S. A. (2015). Supresor Microbiológico S.B. ARVI: Inhibidor/controlador de contaminación para cultivos *in vitro*. Ficha técnica. Documento en línea: <http://www.arvicr.com/productos/fichas-tecnicas/solucion-biocidaft.pdf>. Accesado el 24 de agosto, 2020.
- Chib, S., Thangaraj, A., Kaul, S., Dhar, M. K., & Kaul, T. (2020). Development of a system for efficient callus production, somatic embryogenesis and gene editing using CRISPR/Cas9 in Saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Methods*, 16(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00589-2>
- Corredoira, E., Merkle, S. A., Martínez, M. T., Toribio, M., Canhoto, J. M., Correia, S. I., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (2019). Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(1), 29-97. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., Cheng, S., Zhang, J., & Wang, Y. (2015). Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(2), 397-412. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0711-9>
- Del Bosco, S., Napoli, E., Mercati, F., Abbate, L., Carimi, F., & Ruberto, G. (2017). Somatic cybridization for Citrus: polyphenols distribution in juices and peel essential oil composition of a diploid cybrid Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) and sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(2), 261-275. doi:10.1007/s10722-015-0348-x
- Dinani, E. T., Shukla, M. R., Turi, C. E., Sullivan, J. A., & Saxena, P. K. (2018). Thidiazuron: Modulator of Morphogenesis In Vitro. En N. Ahmad & M. Faisal (Eds.), *Thidiazuron: From*

- Urea Derivative to Plant Growth Regulator* (pp. 1-36). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1
- Elzenga, J., & Bekker, R. (2017). Seed germination: ecological aspects - special issue editorial. *Plant Biology*, 19(1), 3-5. doi:10.1111/plb.12522
- Gamborg, O., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrients requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-168. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Gao, F., Peng, C., Wang, H., Shen, H., & Yang, L. (2020). Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01147-1>
- Genady, E. A. M. (2017). Influence of 2,4-D and picloram on in vitro callus induction from *Verbena bipinnatifida* Nutt. And evaluation of in vivo anti-inflammatory activity of callus extract. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5.
- Georget, F., Courtel, P., Garcia, E., Hidalgo, M., Aplizar, E., Breitler, J., . . . Etienne, H. (2017). Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: a boost for somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 216, 177-185. doi:10.1016/j.scienta.2016.12.017
- Germanà, M., & Lambardi, M. (Edits.). (2016). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Humana Press. doi:10.1007/978-1-4939-3061-6
- Gladfelter, H. J., Johnston, J., Wilde, H. D., & Merkle, S. A. (2020). Adventitious shoot-based propagation of *Franklinia alatamaha* for commercial horticulture and restoration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10087-8>
- Gladfelter, H. J., Johnston, J., Wilde, H. D., & Merkle, S. A. (2020). Somatic embryogenesis and cryopreservation of *Stewartia* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01834-1>

- González-Jiménez, E., & Fisher, R. (1989). Pruebas de almacenamiento de semillas de especies de árboles tropicales. *Memorias del Simposio "Avances en la producción de semillas forestales en América Latina*, (pág. 329). Managua.
- Guan, Y., Li, S.-G., Fan, X.-F., & Su, Z.-H. (2016). Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Frontiers in Plant Science*, 07. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>
- Guerra, M. P., Steiner, N., Farias-Soares, F. L., Vieira, L. do N., Fraga, H. P. F., Rogge-Renner, G. D., & Maldonado, S. B. (2016). Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). En M. A. Germana & M. Lambardi (Eds.), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* (pp. 439-450). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_24
- Hand, M., de Vries, S., & Koltunow, A. (2016). A comparison of in vitro and in vivo asexual embryogenesis. En M. Germana, & M. Lambardi (Edits.), *In vitro embryogenesis in higher plants* (págs. 3-24). Palermo: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-1-4939-3061-6
- Hazubska-Przybyt, T., & Bojarczuk, K. (2016). Tree somatic embryogenesis in science and forestry. *Dendrobiology*, 76, 105-116. doi:10.12657/denbio.076.010
- Hesami, M., Daneshvar, M. H., & Yoosefzadeh-Najafabadi, M. (2019). An efficient in vitro shoot regeneration through direct organogenesis from seedling-derived petiole and leaf segments and acclimatization of *Ficus religiosa*. *Journal of Forestry Research*, 30(3), 807-815. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0647-0>
- Hoveida, Z., Abdollahi, M., Mirzaie-Asl, A., Moosavi, S., & Seguí-Simarro, J. (2017). Production of doubled haploid plants from anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.) by the application of chemical and physical stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130(2), 369-378. doi:10.1007/s11240-017-1233-4
- Huang, H., Wei, Y., Zhai, Y., Ouyang, K., Chen, X., & Bai, L. (2020). High frequency regeneration of plants via callus-mediated organogenesis from cotyledon and hypocotyl cultures in a

- multipurpose tropical tree (*Neolamarkia Cadamba*). *Scientific Reports*, *10*(1), 4558. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61612-z>
- Huettmann, F., & Schmid, M. (2015). A short introduction to tropical land- and seascapes and their wildlife conservation management. En F. Huettmann (Ed.), *Central American Biodiversity: Conservation, Ecology, and a Sustainable Future* (págs. 1-25). Alaska: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-1-4939-2208-6
- Kahia, J., Kirika, M., Lubabali, H., & Mantell, S. (2016). High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaves derived from in vitro-germinated seedlings of a *Coffea arabica* hybrid cultivar. *Horticultural Science*, *51*(9), 1148-1152. doi: 10.21273/HORTSCI10771-16
- Kane, M. (2011). Propagation by shoot culture. En R. Trigiano, & D. Gray (Edits.), *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology* (págs. 181-192). CRC Press Taylor and Francis Group.
- Kane, M., Kauth, P., & Stewart, S. (2016). Micropropagation. En C. Beyl, & R. Trigiano (Edits.), *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises* (págs. 359-370). Florida: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Kaur, A., & Sandhu, J. S. (2015). High throughput in vitro micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agri-business industry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *120*(1), 339-350. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0610-5>
- Kaur, A., Reddy, M. S., & Kumar, A. (2018). Direct somatic embryogenesis of potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivar ‘Kufri Chipsona 2’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *134*(3), 457-466. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1435-4>
- Khan, H., Siddique, I., & Anis, M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annum*. *Biologia Plantarum*, *50*(4), 789-792. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0133-y>

- Kumar, V., Moyo, M., & Van Staden, J. (2015). Somatic embryogenesis of *Pelargonium sidoides* DC. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *121*(3), 571-577. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0726-2>
- Lamboll, R., Stathers, T., & Morton, J. (2017). Climate Change and Agricultural. En S. Snapp, & B. Pound (Edits.), *Agricultural Systems: Agroecology and Rural Innovation for Development* (págs. 441-490). Chatham: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-802070-8.00015-3
- Liang, H., Xiong, Y., Guo, B., Yan, H., Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., Zheng, F., Teixeira da Silva, J. A., Xiong, Y., & Ma, G. (2020). Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*. *Scientific Reports*, *10*(1), 11343. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68084-1>
- Lindgren, D. (2016). The role of tree breeding in reforestation. *Reforesta*, *1*, 221-237. doi:10.21750/REFOR.1.11.11
- Lobo, J., Aguilar, R., Chacón, E., & Fuchs, E. (2008). Phenology of tree species of the Osa Peninsula and Golfo Dulce region, Costa Rica. *Stapfia*, *88*, 547-555.
- Loyola-Vargas, V. (2016). The History of Somatic Embryogenesis. En V. Loyola-Vargas, & N. Ochoa-Alejo (Edits.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (págs. 1-11). México: Springer Science+Business Media. doi:10-1007/978-3-319-33705-0
- Loyola-Vargas, V., & Ochoa-Alejo, N. (2012). An introduction to plant cell culture: the future ahead. En V. Loyola-Vargas, & N. Ochoa-Alejo (Edits.), *Plant Cell Culture Protocols* (págs. 1-8). México: Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-818-4
- Lu, Y., Ranjitkar, S., Harrison, R., Xu, J., Ou, X., & Ma, X. (2017). Selection of native tree species for subtropical forest restoration in southwest China. *PloS ONE*, *12*(1). doi:10.1371/journal.pone.0170418
- Malkamaki, A., D'Amato, D., Hogarth, N., Kanninen, M., Pirard, R., Toppinen, A., & Zhou, W. (2017). The socioeconomic impacts of large-scale tree plantations on local communities: A

- systematic review protocol. *CIFOR Working Paper no. 222*. Bogor, Indonesia: Center for International Forestry Research.
- Mayoral, C., Breugel, M., Cerezo, A., & Hall, J. (2017). Survival and growth of five Neotropical timber species in monocultures and mixtures. *403*, 1-11. doi:10.1016/j.foreco.2017.08.002
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Montalbán, I. A., De Diego, N., & Moncaleán, P. (2010). *Recent observations regarding Pinus radiata somatic embryogenesis using juvenile and mature material*. Somatic Embryogenesis of Forest Trees Conference: 11-20.
- Montero, M., de los Santos Posadas, H., & Kanninen, M. (2007). *Hyeronima alchorneoides: Ecología y silvicultura en Costa Rica*. Turrialba: CATIE.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murillo, O., Badilla, Y., Rojas, F. (2016). Desarrollo del mejoramiento genético forestal en Costa Rica y liderazgo regional con especies tropicales En: XIV CONAFA, 25-27 de octubre, Belén, Costa Rica.
- Pais, M. S. (2019). Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>
- Pal, A., Negi, V. S., & Borthakur, D. (2012). Efficient in vitro regeneration of *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos as explants. *Agroforestry Systems*, *84*(2), 131-140. <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9438-8>

- Peña-Ramírez, Y. J., García-Sheseña, I., Hernández-Espinoza, Á., Domínguez-Hernández, A., Barredo-Pool, F. A., González-Rodríguez, J. A., & Robert, M. L. (2011). Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [Cedrela odorata L. (Meliaceae)]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(2), 203-209. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9853-y>
- Putri, A. I., Prastyono, Haryjanto, L., Herawan, T., Fauzi, A., Izudin, E., Setiawan, A., Suprihati, Hartono, R., Priatna, D., Herdiantara, B., Suharyanto, & Wahno, I. (2020). Effect of methylisothiazolinone biocide in tissue culture sterilization of *Casuarina equisetifolia*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 522, 012008. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/522/1/012008>
- Rajasekharan, P., & Sahijram, L. (2015). In vitro conservation of plant germplasm. En B. Bahadur, M. Rajam, L. Sahijram, & K. Krishnamurthy (Edits.). Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-81-322-2283-5
- Rajpal, V., Rama, S., & Raina, S. (Edits.). (2016). *Molecular breeding for sustainable crop improvement*. Delhi: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-3-319-27090-6
- Rahman, M. M., Mahmood, M., Abdullah, N., Shaharuddin, N. A., & Parvin, W. (2017). Somatic Embryogenesis and Subsequent Plant Regeneration from Zygotic Embryo Derived Callus of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 27(1), 51-61. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v27i1.35012>
- Ribozi, O., Evrard, O., Huon, S., De Rouw, A., Silvera, N., Latsachack, K., & Sengtaheuanghoung, O. (2017). From shifting cultivation to teak plantation: effect on overland flow and sediment yield in a montane tropical catchment. *Scientific Reports*, 7, 1-12. doi:10.1038/s41598-017-04385-2
- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., . . . Ahmad, Z. (2017). Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. En M. Abdin, U. Kiran,

- Kamaluddin, & A. Ali (Edits.), *Plant Biotechnology: Principles and Applications* (págs. 1-36). Singapore: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-981-10-2961-5
- Silveira, S. S., Sant'Anna-Santos, B. F., Degenhardt-Goldbach, J., & Quoirin, M. (2020). Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). *Acta Scientiarum. Agronomy*, *42*, e43798-e43798. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.43798>
- Silvetti, T., Merlini, L., Brasca, M. & Galante, Y. M. (2018). Aerogel from chemo-enzymatically oxidized fenugreek gum: an innovative delivery system of isothiazolinones biocides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-10. Doi: 10.1007/s00253-018-8804-0
- Singh, A. (2015). Micropropagation of plants. En B. Bahadur, M. Rajam, L. Sahijram, & K. Krishnamurthy (Edits.), *Plant Biology and Biotechnology* (págs. 329-346). New Delhi: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-81-322-2283-5
- Singh, C. K., Raj, S. R., Jaiswal, P. S., Patil, V. R., Punwar, B. S., Chavda, J. C., & Subhash, N. (2016). Effect of plant growth regulators on in vitro plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis. *Agroforestry Systems*, *90*(2), 281-288. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9853-3>
- Siyag, P. (2014). *Afforestation, Reforestation and Forest Restoration in Arid and Semi-arid Tropics: A Manual of Technology and Management*. Bonn: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-94-007-7451-3
- Solís, M., & Moya, R. (2003). *Hieronyma alchorneoides en Costa Rica*. Fondo Nacional de Financiamiento Forestal.
- Subiakto, A., Rahmat, H., & Sakai, C. (2016). Choosing native tree species for establishing man-made forest: a new perspective for sustainable forest management in changing world. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *17*(2), 620-625. doi:10.13057/biodiv/d170233

- Syombua, E. D., Wanyonyi, C. N., Adero, M. O., Mbinda, W. M., Ngugi, M. P., Alakonya, A. E., & Oduor, R. O. (2019). Explant type and hormone regime influences somatic embryogenesis and regeneration of cassava. *African Journal of Biotechnology*, *18*(25), 532-539.
- Tenorio, C., Moya, R., Salas, C., & Berrocal, A. (2016). Evaluation of wood properties from six native species of forest plantations in Costa Rica. *Bosque*, *37*(1), 71-76. doi:10.4067/S0717-92002016000100008
- Thakur, M., Soni, M., Sharma, D. P., Vivek, M., & Sharma, V. (2018). In vitro propagation of Plum (*Prunus salicina*) cv. 'Santa Rosa' and assessment of genetic stability using RAPD markers. *Indian Journal of Plant Physiology*, *23*(1), 161-168. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0354-z>
- Urrego, L., & Valle, J. (2001). Relación fenología-clima de algunas especies de los humedales forestales (guandales) del pacífico sur colombiano. *Interciencia*, *26*(4), 150-156.
- Valverde-Cerdas, L., Rojas-Vargas, A., Hine-Gómez, A., & Azofofeifa-Bolaños, J. (2013). Formación de embriones somáticos en *Hyeronima alchorneoides* Allemao a partir de embriones cigóticos. *Biotecnología Vegetal*, *13*(4), 195-202.
- Varshney, A., & Anis, M. (2015). *Trees: Propagation and Conservation*. Aligarh: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-81-322-1701-5
- Vidal, C., Alberdi, I., Hernández, L., & Redmond, J. (Edits.). (2016). *National Forest Inventories*. Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-3-319-44015-6
- Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J., Concepción, Ó., Hernández, M., & Escalona, M. (2017). Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *1-5*. doi:10.1007/s11240-017-1258-8
- Wu, G.-Y., Wei, X.-L., Wang, X., & Wei, Y. (2020). Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *142*(2), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01822-5>

- Yaish, M., Peng, M., & Rothstein, S. (2014). Global DNA methylation analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism (MSAP). En J. Sánchez-Serrano, & J. Salinas (Edits.), *Arabidopsis Protocols* (págs. 285-298). Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-1-62703-580-4_16
- Yan, H., Somika, B., & Chandrasekharan, S. (2016). Biotechnology of tropical tree crops. En M. Anis, & N. Ahmad (Edits.), *Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement* (pág. 247). Singapore: Springer Science+Business Media. doi:10.1007/978-981-10-1917-3
- Yang, J., Yang, D., Lü, W., Zhang, X., Ma, M., Liu, G., Jiang, J., & Li, C. (2020). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Betula platyphalla*. *Journal of Forestry Research*. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01131-9>