

# RESPUESTAS MORFOGÉNICAS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE NOGAL PECANERO (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch)

## MORPHOGENIC RESPONSES IN THE *in vitro* PROPAGATION OF PECAN (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch)

Jazmín A. Ávila-Treviño<sup>1</sup>; Jesús G. Arreola-Ávila<sup>1</sup>; José L. Rodríguez-de la O<sup>2</sup>; Ricardo Trejo-Calzada<sup>1</sup>; David Valdez-Cepeda<sup>3</sup>; Amparo Borja-de la Rosa<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. C. P. 35230. Bermejillo, Dgo.

Correo-e: jgarreola@chapingo.uruza.edu.mx. Tel:872 77601900 (Autor para correspondencia).

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, <sup>4</sup>División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México.

<sup>3</sup>Centro Regional Universitario Centro-Norte. km. 5.5 Carretera Zacatecas-Guadalajara. C. P. 98070. Zacatecas, Zac.

### RESUMEN

Las respuestas embriogénicas y organogénicas en nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) se observaron bajo el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas, yemas axilares y embriones cigóticos. El necrosamiento se controló empleando carbón activado (CA: 1 %), polivinilpirrolidona (0.1 %), nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>: 1 %), ácido cítrico (150 mg·L<sup>-1</sup>) y ácido ascórbico (100 mg·L<sup>-1</sup>), con presencia de luz y en oscuridad. Se utilizó el medio básico de Murashige y Skoog suplementado con 0.40 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3 % de sacarosa, incorporando 2,4-D para hojas, tiazurón (TDZ) para embriones, y las combinaciones de benciladenina (BA), kinetina (KIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) para yemas axilares. El necrosamiento de tejidos se redujo en 75 % y 83 % adicionando CA y AgNO<sub>3</sub>, respectivamente. El 33 % y 66 % de los callos embriogénicos se indujeron a partir de hojas, utilizando 1 y 3 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D. La mayor producción de callos (58 %) a partir de embriones se obtuvo con la concentración de 3 mg·L<sup>-1</sup> de TDZ. En yemas axilares, la combinación de KIN (3.0 µM), BA (1.0 µM) y AIB (0.3 µM) incrementó el número de hojas y plántulas, y longitud de brotes.

PALABRAS CLAVE: Explantes, calogénesis, antioxidantes, reguladores de crecimiento.

### ABSTRACT

Embryogenic and organogenic responses in pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) were observed as a result of the *in vitro* cultivation of segments of leaves, axillary buds and zygotic embryos. Necrosis was controlled through the use of activated carbon (AC: 1%), polyvinylpyrrolidone (0.1 %), silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>: 1 %), citric acid (150 mg·L<sup>-1</sup>) and ascorbic acid (100 mg·L<sup>-1</sup>, in both light and darkness. Murashige and Skoog base medium (MS) was used, supplemented with 0.40 mg·L<sup>-1</sup> of thiamine, 100 mg·L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 3 % saccharose, incorporating 2,4-D for leaves, thidiazuron (TDZ) for embryos, and combinations of benzyladenine (BA), kinetin (KIN) naphthalenacetic acid (ANA) and indolebutyric acid (AIB) for axillary buds. Tissue necrosis was reduced by 75 % and 83 % adding CA and AgNO<sub>3</sub>, respectively. 33 % and 66 % of embryogenic callus originated from leaves, using 1 and 3 mg·L<sup>-1</sup> of 2,4-D. The highest callus production (58 %) from embryos was obtained from the concentration of 3 mg·L<sup>-1</sup> of TDZ. In axillary buds, the combination of KIN (3.0 µM), BA (1.0 µM) and AIB (0.3 µM) increased the number of leaves and seedlings, as well as shoot length.

KEY WORDS: Explants, callogenesis, antioxidants, growth regulators.



Recibido: 15 de septiembre, 2013  
Aceptado: 28 de noviembre, 2013  
doi: 10.5154/r.chscfa.2013.09.037  
<http://www.chapingo.mx/revistas>

## INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) es una especie forestal cultivada, cuya importancia económica radica en la demanda de la nuez por el mercado de Estados Unidos y recientemente por el mercado asiático. Esta especie es originaria del norte de México, cuyas poblaciones de árboles silvestres se desarrollan principalmente en áreas con presencia de ríos o arroyos. Actualmente se han identificado materiales criollos de importancia biológica y comercial. Estas características se han tomado en cuenta en programas de mejoramiento llevados a cabo en otros países (Thompson & Grauke, 2012), incluyendo otras especies leñosas como *Pinus pinaster* Ait. (Álvarez, Majada, & Ordás, 2009). La especie *C. illinoensis* es difícil de enraizar y los portainjertos utilizados en las huertas, cuya superficie es de 98,000 ha, provienen de semilla. La propagación sexual en esta especie es lenta y segrega individuos con variación fenotípica considerable, característica que limita la homogeneidad de los portainjertos utilizados en las plantaciones comerciales (Moore, Williams, Palma, & Lombardini, 2009). La reproducción *in vitro* constituye actualmente un excelente método potencial para la multiplicación clonal masiva en genotipos élite de nogal pecanero (Thompson & Grauke, 2012), incluyendo otras especies forestales (Lelu-Walter, Bernier-Cardou, & Klimaszewska, 2006; Percy, Klimaszewska, & Cyr, 2000). Existen estudios que describen protocolos de micropropagación de *P. pinaster* basados en organogénesis y embriogénesis somática, utilizando medios de cultivo que contienen tanto reguladores de crecimiento como antioxidantes (Álvarez et al., 2009). Varios antioxidantes se han aplicado en el medio de cultivo para disminuir el necrosamiento del tejido durante la etapa de iniciación de los explantes extraídos de especies leñosas (Aliyu, 2005; Nomura, Matsumoto, Masuda & Inoue, 1998; Poornima & Ravishankar, 2007; Vieitez, Vieitez et al., 2009). En la micropropagación de nogal se han utilizado diferentes tipos de tejido de la planta (Rodríguez & Wetzstein, 1994), así como embriones somáticos (Long, Preece, & Sambecck, 1995). El tipo de tejido, la edad de la planta, el tipo de reguladores de crecimiento, las sales adicionadas al medio, así como las condiciones durante el desarrollo del explante, son detalles que se han considerado en la micropropagación de especies leñosas (De la Viña, Barceló-Muñoz, & Pliego-Alfaro, 2001; Huang, Shaolin, Gaofeng, & Lanying, 2002; Labardi, Herry, Menabeni & Thorpe, 1995; Long et al., 1995). La creciente demanda de la nuez y la necesidad de una técnica efectiva de propagación masiva de materiales criollos de nogal con potencial productivo, incluyendo materiales nativos de importancia biológica para el uso en programas de mejoramiento genético, conducen al establecimiento de nuevas tecnologías de propagación. En la actualidad se generan nuevas tecnologías que prometen ser rentables en este ámbito, como el cultivo de tejidos *in vitro* (Long et al., 1995; Rugini & Muganu, 1998; Scaltsoyianes, Tsoulpha, Panetsos, & Moulalis, 1998; Valderrama, Chico, Tejada, & Vega, 2008). El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de evaluar las respuestas morfológicas de explantes de nogal pecane-

## INTRODUCTION

Pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) is a cultivated forest species, whose economic importance resides in the demand of pecan by the U. S. market and recently by the Asian market. This species has its origin in the north of Mexico, whose populations of wild trees are developed mainly in areas with presence of rivers or streams. Recently native materials of biological and economic importance have been identified. These characteristics have been considered in improvement programs carried out in other countries (Thompson & Grauke, 2012), including other woody species such as *Pinus pinaster* Ait. (Álvarez, Majada & Ordás, 2009). The species *C. illinoensis* is difficult to root and the rootstocks used in the orchards, whose surface is of 98,000 ha, are from seed. The sexual propagation in this species is slow and segregates individuals with considerable phenotypic variation, characteristic that limits the homogeneity of the rootstocks utilized in the commercial plantations (Moore, Williams, Palma & Lombardini, 2009). *In vitro* production is presently an excellent potential method for the massive clonal multiplication in elite genotypes of pecan (Thompson & Grauke, 2012), including other forest species (Lelu-Walter, Bernier-Cardou & Klimaszewska, 2006; Percy, Klimaszewska & Cyr, 2000). There are studies that describe micropropagation protocols of *P. pinaster* based on organogenesis and somatic embryogenesis, using culture methods that contain both growth regulators and antioxidants (Álvarez et al., 2009). Various antioxidants have been applied in the culture medium to reduce tissue necrosis during the initiation stage of the explants extracted from woody species (Aliyu, 2005; Nomura, Matsumoto, Masuda & Inoue, 1998; Poornima & Ravishankar, 2007; Vieitez et al., 2009). In pecan micropropagation different types of tissue of the plant have been used (Rodríguez & Wetzstein, 1994), as well as somatic embryos (Long, Preece & Sambecck, 1995). Tissue type, plant age, type of growth regulators, salts added to the medium, as well as the conditions during the development of the explants are details that have been considered in the micropropagation of woody species (De la Viña, Barceló-Muñoz, & Pliego-Alfaro, 2001; Huang, Shaolin, Gaofeng, & Lanying, 2002; Labardi, Herry, Menabeni & Thorpe, 1995; Long et al., 1995). The growing demand for pecan and the need for an effective massive propagation technique of native pecan materials with productive potential, including native materials of biological importance for the use in genetic improvement programs, lead to the establishment of new propagation technologies. New technologies are presently being generated that promise to be profitable in this context, such as *in vitro* tissue culture (Long et al., 1995; Rugini & Muganu, 1998; Scaltsoyianes, Tsoulpha, Panetsos, & Moulalis, 1998; Valderrama, Chico, Tejada, & Vega, 2008). The present study was conducted with the purpose of evaluating the morphogenic responses of pecan explants, from leaves, buds and embryos, developed in culture medium added with different types and concentrations of antioxidants, growth regulators and light conditions.

ro, provenientes de hojas, yemas y embriones, desarrollados en medio de cultivo adicionado con diferentes tipos y concentraciones de antioxidantes, reguladores de crecimiento y condiciones de luz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fuente de explantes y condiciones de cultivo

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México. Se utilizaron plantas de nogal pecanero de un año de edad, germinadas en maceta en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas en Bermejillo, Durango. Las plantas fueron trasladadas a la Universidad Autónoma Chapingo cuando tenían una altura de 25 cm. En este sitio fueron acondicionadas en el invernadero por 21 días y regadas semanalmente con una solución de fungicida (Captan®) al 2 %. Transcurrido este periodo, los explantes fueron extraídos de yemas, hojas y embriones de semillas. Las yemas axilares y las hojas fueron seleccionadas de la parte basal, media y terminal de las plantas. Previo a la extracción de los embriones, las semillas se estratificaron durante 24 h en una solución de agua oxigenada y destilada. Los explantes de hojas, yemas y embriones se colocaron en una solución de detergente Foca más surfactante Tween 80 (Thermo Scientific, USA) por 2 min. Posteriormente, los explantes se colocaron en alcohol al 70 % durante 3 min y, finalmente, en hipoclorito de sodio al 10 % por 15 min. Los tejidos se mantuvieron por 24 h en una solución de ácido ascórbico (100 mg·L<sup>-1</sup>) más ácido cítrico (150 mg·L<sup>-1</sup>) disueltos en 100 mL de agua destilada, aforada a 1 L. En el presente estudio se condujeron cuatro experimentos para evaluar las respuestas morfogénicas durante la propagación *in vitro* de nogal.

### Evaluación de antioxidantes

Segmentos foliares de 1 cm<sup>2</sup> se sembraron en posición abaxial en medio de cultivo MS, propuesto por Murashige y Skoog (1962), utilizando frascos tipo Gerber®. El efecto antioxidante se evaluó adicionando en el medio diferentes porcentajes de carbón activado (CA), polivinilpirrolidona (PVP) y nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), así como diferentes concentraciones de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) y ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>). En el Cuadro 1 se presentan los tratamientos evaluados. Las muestras con sus respectivos tratamientos se incubaron en oscuridad permanente o en un periodo de luz/oscuridad (16:8) a una temperatura de 25 ± 1 °C, durante cuatro semanas. Los tratamientos se repitieron 12 veces, considerando un explante por frasco como unidad de muestreo. Al factor luz se le asignaron los valores 1 (luz) y 2 (luz/oscuridad). La variable tejido necrosado se midió a través de una escala visual con los siguientes valores asignados: 1) nivel bajo de necrosamiento (< 30 %); 2) nivel medio (> 30 % < 60 %); 3) nivel alto (> 60 %). Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico Minitab versión 15 (2009). Los datos se analizaron en

## MATERIALS AND METHODS

### Source of explants and culture conditions

The present study was carried out in the Plant Cell Culture Laboratory of the Plant Science department of the Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, State of Mexico. Pecan plants of one year of age were used, germinated in pots in the Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas in Bermejillo, Durango. The plants were taken to the Universidad Autónoma Chapingo when they reached a height of 25 cm. In this site they were conditioned with a fungicide solution (Captan®) at 2 %. After this period, the explants were extracted from buds, leaves and seed embryos. The axillary buds and the leaves were selected from the basal, middle and terminal part of the plants. Prior to the extraction of the embryos, the seeds were stratified during 24 h in a solution of oxygenated and distilled water. The explants of leaves, buds and embryos were placed in a solution of Foca detergent plus Tween 80 surfactant (Thermo Scientific, USA) for 2 min. Afterwards, the explants were placed in alcohol at 70 % during 3 min, and finally, in sodium hypochlorite at 10 % for 15 min. The tissues were maintained for 24 h in a solution of ascorbic acid (100 mg·L<sup>-1</sup>) plus citric acid (150 mg·L<sup>-1</sup>) dissolved in 100 mL of distilled water, gauged to 1 L. In the present study for experiments were conducted to evaluate the morphogenic responses during the *in vitro* propagation of pecan.

### Evaluation of antioxidants

Leaf segments of 1 cm<sup>2</sup> were sown in abaxial position in MS culture medium, proposed by Murashige and Skoog (1962), using Gerber® jars. The antioxidant effect was evaluated by adding to the medium different percentages of activated carbon (AC), polyvinylpyrrolidone (PVP) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>), as well as different concentrations of nitric acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) and ascorbic acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>). Table 1 shows the treatments evaluated. The samples with their respective treatments were incubated in permanent darkness or in a period of light/darkness (16:8) at a temperature of 25 ± 1 °C, during four weeks. The treatments were repeated 12 times, considering an explants per jar as sampling unit. The values 1 (light) and 2 (light/darkness) were assigned to the light factor. The variable necrotic tissue was measured with a visual scale with the following assigned values: 1) low level of necrosis (< 30 %); 2) medium level (> 30 % < 60 %); 3) high level (> 60 %). The results were evaluated by means of analysis of variance, using the statistical package Minitab version 15 (2009). The data were analyzed in an experimental design of divided plots, considering the light condition factor as main plot and the different concentrations of solutions as subplots. The comparison of means among treatments was made with the Tukey test (*P* ≤ 0.05).

### Organogenesis in explants of leaves

For the study of organogenesis in leaves, 1, 3 and 10 mg·L<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were used as treatments, which were added to the MS culture medium, which

CUADRO 1. Antioxidantes aplicados en explantes de hojas cultivadas en medio Murashige y Skoog, suplementado con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3 % de sacarosa, 7.5 g·L<sup>-1</sup> de agar-agar, a un pH de 5.7 ± 0.1.

TABLE 1. Antioxidants applied in explants of leaves cultivated in Murashige and Skoog culture medium, supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> of thiamin, 100 mg·L<sup>-1</sup> of mio-inositol, 3 % of saccharose, 7.5 g·L<sup>-1</sup> of agar-agar, at a pH of 5.7 ± 0.1.

Tratamientos / Treatments	Carbón activado / Activated carbon (%)	Polivinilpirrolidona / Polyvinylpyrrolidone (%)	AgNO <sub>3</sub> (%)	Ácido cítrico / Citric acid (mg·L <sup>-1</sup> )	Ácido ascórbico / Ascorbic acid (mg·L <sup>-1</sup> )
T0	0	0	0	0	0
T1	1	0	0	0	0
T2	0	0.1	0	0	0
T3	0	0	1	0	0
T4	0	0	0	150	100

un diseño experimental de parcelas divididas, considerando el factor condición de luz como parcela principal y las diferentes concentraciones de soluciones como subparcelas. La comparación de medias entre tratamientos se hizo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### Organogénesis en explantes de hojas

Para el estudio de organogénesis en hojas se utilizaron 1, 3 y 10 mg·L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como tratamientos, los cuales se adicionaron al medio de cultivo MS, mismo que se suplementó con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3 % de sacarosa y 7.5 g·L<sup>-1</sup> de agar-agar a un pH de 5.7 ± 0.1. Segmentos foliares de 1 cm<sup>2</sup>, seleccionados de la parte basal, media y terminal de la planta, fueron sembrados en forma abaxial en frascos tipo Gerber<sup>®</sup> conteniendo el medio de cultivo. Las muestras se mantuvieron en oscuridad permanente a una temperatura de 25 ± 1 °C, durante cuatro semanas. Los tratamientos se aplicaron considerando un diseño completamente al azar con doce repeticiones. La variable cuantitativa encallamiento, expresada como peso fresco, fue evaluada mediante análisis de varianza utilizando el paquete estadístico Minitab versión 15 (2009) y efectuando una comparación de medias entre tratamientos con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). La variable estructura de callo fue evaluada cualitativamente; de acuerdo con su característica física se asignaron tres valores: 0 (sin respuesta), 1 (estructura compacta) y 2 (estructura friable). La variable color de callo se midió con la siguiente escala: 1) blanco, 2) rosa y 3) café.

#### Organogénesis en explantes de yemas

Se usaron yemas axilares de 1 cm de longitud obtenidas de la porción basal, media y apical de la planta. Las yemas se sembraron en tubos Erlenmeyer que contenían medio de cultivo MS suplementado con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3 % de sacarosa, 7.5 g·L<sup>-1</sup> de agar-agar, a un pH de 5.7. Se establecieron dos tratamientos con auxinas y citocininas en diferentes combinaciones y concentraciones agregadas al medio de cultivo (Cuadro 2). Las muestras se incubaron durante 12 semanas bajo un periodo de luz/oscu-

was supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> of thiamine, 100 mg·L<sup>-1</sup> of mio-inositol, 3 % of saccharose and 7.5 g·L<sup>-1</sup> of agar-agar at a pH of 5.7 ± 0.1. Leaf segments of 1 cm<sup>2</sup>, selected from the basal, middle and terminal part of the plant were sown in abaxial form in Gerber<sup>®</sup> jars containing the culture medium. The samples were maintained in permanent darkness at a temperature of 25 ± 1 °C during four weeks. The treatments were applied considering a completely randomized design with twelve replicates. The variable quantitative callusing, expressed as fresh weight, was evaluated through analysis of variance using the statistical package Minitab version 15 (2009) and making a comparison of means among treatments with the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). The variable callus structure was evaluated qualitatively; three values were assigned according to its physical characteristic: 0 (without response), 1 (compact structure) and 2 (friable structure). The variable callus color was measured with the following scale: 1) white, 2) pink and 3) brown.

#### Organogenesis in explants of buds

Axillary buds of 1 cm length were used, obtained from the basal, middle and apical portion of the plant. The buds were sown in Erlenmeyer tubes that contained MS culture medium supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> of thiamine, 100 mg·L<sup>-1</sup> of mio-inositol, 3 % of saccharose, 7.5 g·L<sup>-1</sup> of agar-agar, at a pH of 5.7. Two treatments were established with auxins and cytokinins in different combinations and concentrations added to the culture medium (Table 2). The samples were incubated during 12 weeks under a period of light/darkness (18:6), at a temperature of 25 ± 1 °C. The variables number of shoots, number of leaves and plant length were evaluated. The data were subjected to an analysis of variance with the statistical package PASW version 18 (2009). A completely randomized experimental design was used with twelve replicates and a comparison of means was made among treatments with the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

#### Callogenesis in explants of embryo

In this experiment the treatments of thidiazuron (TDZ) were established in quantities of 1, 3 and 10 mg·L<sup>-1</sup> added

CUADRO 2. Auxinas y citocininas aplicadas en explantes de yemas cultivadas en medio Murashige y Skoog, suplementado con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 3 % de sacarosa, 7.5 g·L<sup>-1</sup> de agar-agar, a un pH de 5.7.

TABLE 2. Auxins and cytokinins applied in explants of buds cultivated in Murashige and Skoog, supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 3 % of saccharose, 7.5 g·L<sup>-1</sup> of agar-agar, at a pH of 5.7.

Tratamientos / Treatments	Benciladenina / Benzyladenine (mg·L <sup>-1</sup> )	Kinetina <sup>*</sup> / Kinetin <sup>*</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	Ácido naftalenacético / Naphthalenacetic acid (mg·L <sup>-1</sup> )	Ácido indolbutírico / Indolebutyric acid(mg·L <sup>-1</sup> )
T1	3	1	0.3	0.0
T2	1	3	0.0	0.3

\*Kinetina / Kinetin: 6-Furfurilaminopurina.

ridad (18:6), a una temperatura de 25 ± 1 °C. Las variables número de brotes, número de hojas y longitud de la planta fueron evaluadas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza con el paquete estadístico PASW versión 18 (2009). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con doce repeticiones y se hizo comparación de medias entre tratamientos con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### Calogénesis en explantes de embrión

En este experimento se establecieron los tratamientos de tiazurón (TDZ) en cantidades de 1, 3 y 10 mg·L<sup>-1</sup> adicionados al medio de cultivo MS, suplementado con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 3 % de sacarosa, 7.5 g·L<sup>-1</sup> de agar-agar, a un pH de 5.7 ± 0.1. Los embriones extraídos de las nueces maduras, previamente tratadas con agua destilada, fueron sembrados en frascos Erlenmeyer que contenían medio de cultivo. Doce muestras de cada tratamiento se incubaron en condiciones de oscuridad, a 25 ± 1 °C, durante 12 semanas. Se evaluaron las variables peso fresco de callo, grado de encallamiento desarrollado, así como estructura y color. La variable grado de encallamiento se midió de acuerdo con la siguiente escala numérica: 1) desarrollo de callo con volumen ≤ 30 %; 2) desarrollo calloso con volumen > 30 % y < 60 %; 3) desarrollo de callo con volumen > 60 %. Los grados de encallamiento establecidos se definieron a partir de la referencia visual, considerando que el mayor volumen de encallamiento correspondió a 100 %. El tipo de estructura de callos (compacta y friable) se caracterizó visualmente, así como el color de los mismos (blanco, amarillo y café). Se consideró un diseño experimental completamente al azar, con doce repeticiones. La variable grado de encallamiento se sometió a un análisis de varianza con el paquete estadístico Minitab versión 15 (2009). La comparación de medias entre tratamientos se hizo mediante una prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico PASW versión 18 (2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de antioxidantes

Se observó una respuesta significativa entre tratamientos de antioxidantes, evaluados a las cuatro semanas de efectuada

to the MS culture medium, supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 3 % of saccharose, 7.5 g·L<sup>-1</sup> of agar-agar, a pH of 5.7 ± 0.1. The embryos extracted from the mature nuts, previously treated with distilled water, were sown in Erlenmeyer jars that contained culture medium. Twelve samples of each treatment were incubated under conditions of darkness, at 25 ± 1 °C, during 12 weeks. The variables fresh weight of callus, degree of callusing developed, structure and color were evaluated. The variable degree of callusing was measured according to the following numerical scale: 1) development of callus with volume ≤ 30 %; 2) callus development with volume > 30 % and < 60 %; 3) development of callus with volume > 60 %. The degrees of callusing 15 established were defined from visual reference, considering that the highest volume of callusing corresponded to 100 %. The type of callus structure (compact and friable) was characterized visually, as well as their color (white, pink and brown). A completely randomized experimental design was considered, with twelve replicates. The variable degree of callusing was subjected to an analysis of variance with the statistical package Minitab version 15 (2009). The comparison of means among treatments was made with a Tukey test ( $P \leq 0.05$ ) with the statistical package PASW version 18 (2009).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Evaluation of antioxidants

A significant response was observed among treatments of antioxidants, evaluated four weeks after the sowing of explants of leaves. The AC and the AgNO<sub>3</sub> significantly reduced ( $P \leq 0.05$ ) the degree of tissue necrosis with respect to the control, which was similar to that observed in the explants treated with citric acid and ascorbic acid at 150 and 100 mg·L<sup>-1</sup>, respectively (Figure 1). With the treatments of AC and AgNO<sub>3</sub>, 75 % and 83 % of explants were obtained, respectively, with less than 30 % of necrotic tissue. The results found here coincide with those reported by Poornima and Ravishankar (2007), who found that the AC was more effective than the PVP in the reduction of the phenolic exudation in *Psidium guajava* L. These authors also observed that 60 % of the explants sown in the MS culture medium supplemented with PVP presented oxidation after 30 days

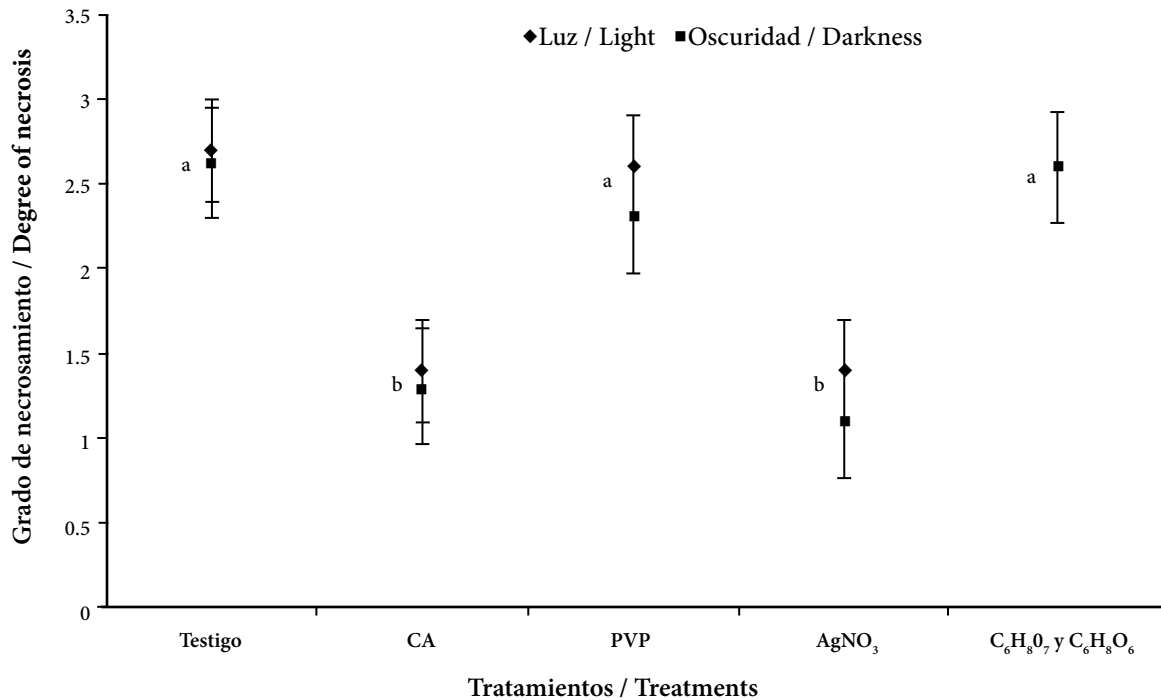


FIGURA 1. Efecto de carbón activado (CA, 1 %), polivinilpirrolidona (PVP, 0.1 %), nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>, 1 %), ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 150 mg·L<sup>-1</sup>) y ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 100 mg·L<sup>-1</sup>) sobre el grado de necrosamiento en explantes de hojas, cuatro semanas después de cultivo. Barras verticales representan el error típico. Medias (n = 12) con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

FIGURE 1. Effect of activated carbon (AC, 1 %), polyvinylpyrrolidone (PVP, 0.1 %), silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>, 1 %), citric acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 150 mg·L<sup>-1</sup>) and ascorbic acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 100 mg·L<sup>-1</sup>) over the degree of necrosis in explants of leaves, four weeks after cultivation. Vertical bars represent the typical error. Means (n = 12) with different letters are statistically different (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

la siembra de explantes de hojas. El CA y el AgNO<sub>3</sub> redujeron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el grado de necrosamiento de tejido en comparación con el testigo, el cual fue similar al observado en los explantes tratados con ácido cítrico y ascórbico a razón de 150 y 100 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1). Con los tratamientos de CA y AgNO<sub>3</sub> se lograron 75 % y 83 % de explantes, respectivamente, con menos de 30 % del tejido necrosado. Los resultados aquí encontrados coinciden con los reportados por Poornima y Ravishankar (2007), quienes encontraron que el CA fue más eficaz que el PVP en la disminución de la exudación fenólica en *Psidium guajava* L. Estos autores también observaron que 60 % de los explantes sembrados en el medio de cultivo MS, suplementado con PVP, mostró oxidación después de 30 días de incubación. En encino, la aplicación de 3 mg·L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> disminuyó el necrosamiento y la senescencia temprana de explantes de hojas durante la etapa de iniciación (Vieitez et al., 2009). Los efectos deletéreos en *P. pinaster*, debido a los fenoles, también fueron reducidos por la adición de CA en el medio de cultivo como lo señala Lelu-Walter et al. (2006) y Álvarez et al. (2009), quienes sugieren que este resultado puede atribuirse a la propiedad higroscópica del compuesto en el medio de iniciación. En manzano, el necrosamiento

of incubation. In oak, the application of 3 mg·L<sup>-1</sup> of AgNO<sub>3</sub> reduced necrosis and early senescence of explants of leaves during the initiation stage (Vieitez et al., 2009). The deleterious effects in *P. pinaster*, due to the phenols, were also reduced by the addition of AC in the culture medium as pointed out by Lelu-Walter et al. (2006) and Álvarez et al. (2009), who suggested that this result can be attributed to the hygroscopic property of the compound in the initiation medium. In apple, the apical necrosis of buds considerably limits its development; however, the application of glutathione induced the normal development of shoots and leaves during the initiation of explants (Nomura et al., 1998). The positive effect of AgNO<sub>3</sub> as anti-oxidizing agent on the normal development of explants indicates the importance that the use of compounds could have on *C. illinoensis*, woody species in which the oxidation of tissues cultivated *in vitro* is a problem.

With respect to the condition of light/darkness, no significant effect ( $P \leq 0.05$ ) was observed in the necrosis of the developed explants. Therefore, it is induced that any environmental condition during the initiation of explants in *C. illinoensis* can be adequate. However, it appears that the

apical de brotes limita considerablemente su desarrollo; sin embargo, la aplicación de glutatión indujo el desarrollo normal de brotes y hojas durante la iniciación de explantes (Nomura et al., 1998). El efecto positivo de  $\text{AgNO}_3$  como agente antioxidante sobre el desarrollo normal de explantes indica la importancia que podría tener la utilización de compuestos sobre *C. illinoensis*, especie leñosa en la cual la oxidación de tejidos cultivados *in vitro* es un problema.

Respecto a la condición de luz-obscuridad, no se observó efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) sobre el necrosamiento de los explantes desarrollados. Por lo anterior, se induce que cualquier condición ambiental durante la iniciación de explantes en *C. illinoensis* puede ser adecuada. No obstante, parece ser que la ausencia de luz durante esta etapa es más conveniente, según lo señala el estudio llevado a cabo en *Anacardium occidentale* L. por Aliyu (2005), quien obtuvo brotes de explantes desarrollados en un medio de cultivo con CA, en condición de oscuridad. Mulwa y Bhalla (2006) obtuvieron resultados similares durante la iniciación de explantes de cotiledones de macadamia en condiciones de oscuridad. En aguacate, el incremento de radiación no tuvo efecto sobre la brotación de explantes (De la Viña et al., 2001). Por otra parte, Lelu-Walter et al. (2006) observaron desarrollo de epicotilos largos y en buen estado en embriones de *P. pinaster* desarrollados sin luz, lo cual no sucedió en los embriones iniciados en presencia de luz, cuyos epicotilos estresados mostraron un color rojo necrosado, causado posiblemente por la síntesis de antocianinas. La condición ambiental relacionada con la radiación o su régimen con oscuridad parece no ser factor limitante, según las observaciones efectuadas en el presente estudio.

### Organogénesis en explantes de hojas

Las concentraciones de 1 y 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D indujeron el mayor peso fresco de callos desarrollados en los explantes a las 12 semanas de iniciado el cultivo (Figura 2). Estas concentraciones agregadas al medio de cultivo incrementaron dos y tres veces más la presencia de callo en los explantes, en relación con la concentración de 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 3). La posición del tallo de la cual se extrajeron las hojas no tuvo efecto sobre la producción de biomasa producida por los explantes. Esto significa que las hojas ubicadas en la porción basal, media o apical tienen la misma capacidad organogénica. La respuesta en el incremento de callo a bajas concentraciones de 2,4-D difiere con lo reportado por Huang et al. (2002), quienes observaron mayor producción callogénica en explantes de hojas jóvenes de *Citrus grandis* en medio que contenía 0.9 y 4.5 mM de 2,4-D. Salvi, Singh, Tivarekar, y Eapan (2001) indujeron brotes en explantes de hojas jóvenes de neem, desarrollados en medio con benciladenina y ácido indolacético. Estos resultados indican que en la regeneración de explantes de especies leñosas, el medio de cultivo y las cantidades apropiadas de sus componentes es importante, como lo es también la edad del tejido seleccionado. No obstante, en el presente estudio, la posición de la hoja en el tallo no marcó diferencia por tratarse de plantas

absence of light during this stage is more convenient, according to what was indicated in the study carried out in *Anacardium occidentale* L. by Aliyu (2005), who obtained shoots of explants developed in a culture medium with AC, under conditions of darkness. Mulwa and Bhalla (2006) obtained similar results during the initiation of explants of cotyledons of macadamia under conditions of darkness. In avocado, the increment of radiation had no effect on the sprouting of explants (De la Viña et al., 2001). On the other hand, Lelu-Walter et al. (2006) observed development of long epicotyls and in good condition in embryos of *P. pinaster* developed without light, which did not occur in the embryos initiated in the presence of light, whose stressed epicotyls presented a necrotic red color, possibly caused by the synthesis of anthocyanins. The environmental condition related to radiation or its regime with darkness does not seem to be a limiting factor, according to the observations made in the present study.

### Organogenesis in explants of leaves

The concentrations of 1 and 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of 2,4-D induced the highest fresh weight of calluses developed in the explants at 12 weeks after initiating the culture (Figure 2). These concentrations added to the culture medium incremented two and three times more the presence of callus in the explants, with respect to the concentration of 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 3). The position of the stem from which the leaves were extracted had no effect on the production of biomass produced by the explants. This means that the leaves located in the basal, middle or apical portion have the same organogenic capacity. The response in the increment of callus at low concentrations of 2,4-D differs from what was reported by Huang et al. (2002), who observed higher callogenic production in explants of young leaves in *Citrus grandis* in medium that contained 0.9 and 4.5 mM of 2,4-D. Salvi, Singh, Tivarekar, and Eapan (2001) induced shoots in explants of young neem leaves, developed in medium with benzyladenine and indolacetic acid. These results indicate that in the regeneration of explants of woody species, the culture medium and the appropriate amounts of their components is important, as is the age of the selected tissue. However, in the present study, the position of the leaf on the stem did not mark a difference due to the fact that young plants of four months of age were used. The treatments had a significant effect ( $P \leq 0.01$ ) on the type of structure and color of callus. The concentrations of 1 and 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of 2,4-D induced a friable structure (Figure 3). This type of structure was found by Kryvenki, Kosky, Guerrero, Dominguez and Reyes (2008), who obtained friable globular calluses, cultivated in a medium with 2.26  $\mu\text{M}$  of 2,4-D, under conditions of darkness. The calluses presented the colors white, pink and brown (Figure 3), although a higher sequence of white calluses was observed. These results coincide with what was reported by Kryvenki et al. (2008) in obtaining calluses of the same colors. Tavakol, Angoshtari and Kalantaril (2011), when evaluating the effects of the growth regulators on the color of callus, found that the auxins had an inhibitory effect on the formation of

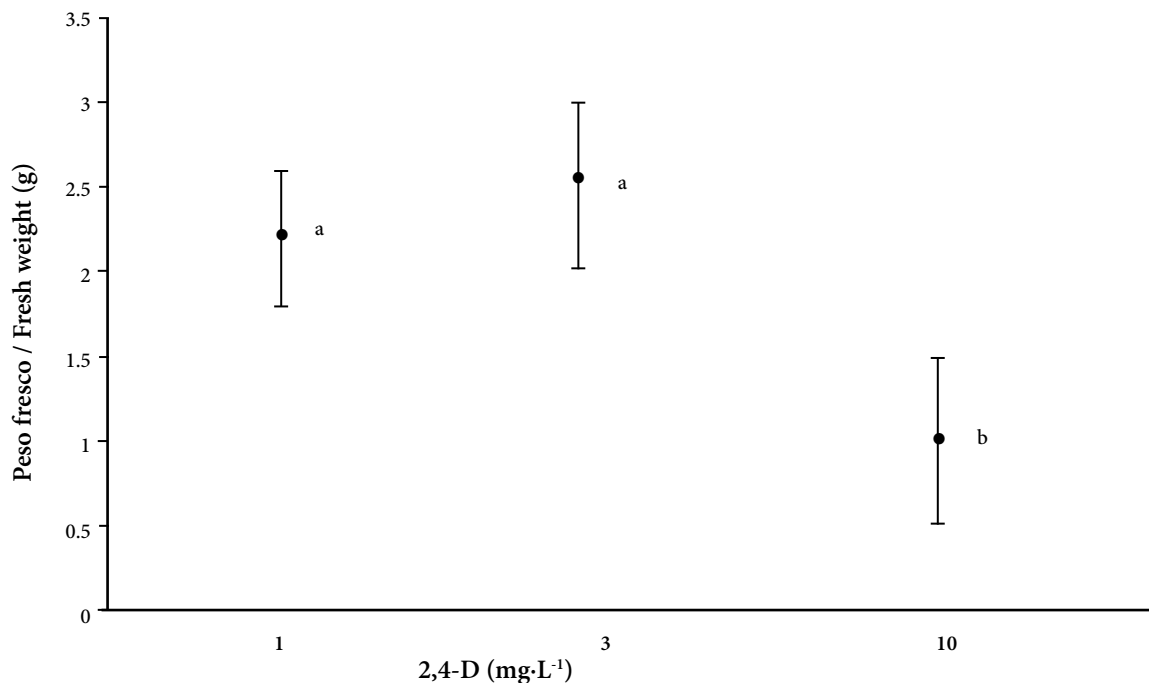


FIGURA 2. Peso fresco de callos en explantes de hoja, cultivados durante cuatro semanas en medio Murashige y Skoog adicionado con 2,4-D. Barras verticales representan el error típico. Medias ( $n = 12$ ) con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

FIGURE 2. Fresh weight of calluses in explants of leaf, cultivated during four weeks in Murashige and Skoog culture medium added with 2,4-D. Vertical bars represent the typical error. Means ( $n = 12$ ) with different letters are statistically different (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

jóvenes de cuatro meses de edad. Los tratamientos tuvieron un efecto significativo ( $P \leq 0.01$ ) sobre el tipo de estructura y color del callo. Las concentraciones de 1 y 3 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D indujeron una estructura friable (Figura 3). Este tipo de estructura fue encontrada por Kryvenki, Kosky, Guerrero, Domínguez, y Reyes (2008), quienes obtuvieron callos friables de tipo globular, cultivados en un medio con 2.26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, bajo condiciones de oscuridad. Los callos presentaron colores blanco, rosa y café (Figura 3), aunque se observó mayor secuencia de callos color blanco. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kryvenki et al. (2008) al obtener callos de los mismos colores. Tavakkol, Angoshtari y KalantariI (2011), al evaluar los efectos de los reguladores del crecimiento sobre el color de callo, encontraron que las auxinas tenían un efecto inhibitorio sobre la formación de la clorofila. Estos autores agregan que en ausencia de luz y con ausencia de pigmentos clorofílicos, distintos colores pueden surgir debido a la manifestación de otro tipo de pigmento, como lo observado en este estudio.

#### Organogénesis en explantes de yemas

La respuesta organogénica de explantes de yemas fue afectada por el tipo y concentración de auxinas y citocininas en el medio de cultivo. La combinación de kinetina (KIN),

chlorophyll. These authors add that in absence of light and with absence of chlorophyllic pigments, different colors can appear due to the manifestation of another type of pigment, such as that observed in this study.

#### Organogenesis in explants of buds

The organogenic response of explants of buds was affected by the type and concentration of auxins and cytokinins in the culture medium. The combination of kinetin (KIN), benzyladenine (BA) and indolebutyric acid (AIB) induced a higher number of shoots and leaves, as well as a higher growth of seedlings, compared with the addition of KIN, BA and naphthalenetic acid (ANA) (Figure 4). The effects of BA and AIB in explants of *Juglans regia*, from elite trees, have also been observed by Scaltsoyiannes, Tsoulpha, Panestos, and Moulalis (1998). The authors report an increment of lateral shoots developed in explants initiated in culture medium, adding BA (4.4  $\mu\text{M}$ ) in combination with AIB (0.005  $\mu\text{M}$ ). Ollero, Muñoz, Segura and Arrillaga (2010) observed in *Nerium olander* L. the presence of axillary shoots in explants of buds developed in culture medium, adding a combination of BA and potassium. Uribe and Cifuentes (2004) developed seedlings of *Legrandia concinna* from explants of axillary buds, developed in a medium with



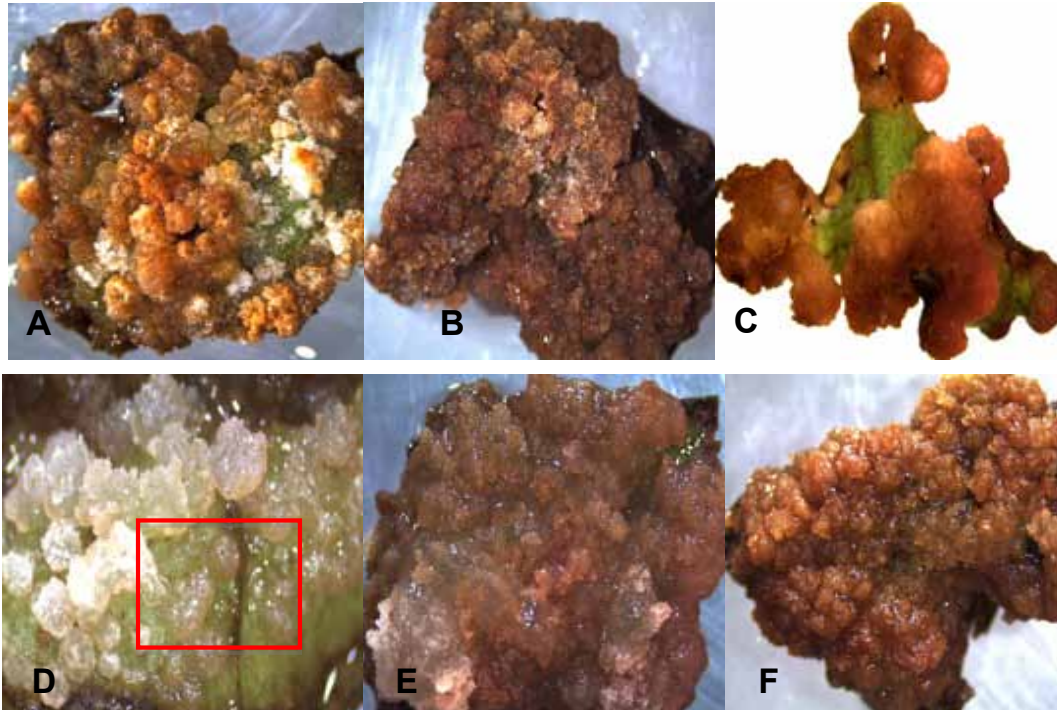


FIGURA 3. Biomasa callogénica en explantes de hojas cultivadas durante cuatro semanas en medio Murashige y Skoog con 2,4-D a razón de 1 mg·L<sup>-1</sup> (A); 3 mg·L<sup>-1</sup> (B) y 10 mg·L<sup>-1</sup> (C). Callos de tipo friable con color blanco (D) y rosado (E), y de tipo compacto de color café (F), resultantes de las concentraciones mencionadas respectivamente. Estructuras pre-embionarias de tipo globular dentro del recuadro en la Figura D.

FIGURE 3. Callogenic biomass in explants of leaves cultivated four weeks in Murashige and Skoog culture medium with 2,4-D at 1 mg·L<sup>-1</sup> (A); 3 mg·L<sup>-1</sup> (B) and 10 mg·L<sup>-1</sup> (C). White (D) and pink (E) friable calluses and compact brown calluses (F) resulting from the abovementioned concentrations. Globular pre-embryo structures are within Figure D.

benciladenina (BA) y ácido indolbutírico (AIB) indujo mayor número de brotes y hojas, así como mayor crecimiento de plántulas, en comparación con la adición de KIN, BA y ácido naftalenacético (ANA) (Figura 4). Los efectos de BA y AIB en explantes de *Juglans regia*, procedentes de árboles élite, también han sido observados por Scaltsoyiannes, Tsoulpha, Panestos, y Moulalis (1998). Los autores reportan un incremento de brotes laterales desarrollados en explantes iniciados en medio de cultivo, adicionando BA (4.4 μM) en combinación con AIB (0.005 μM). Ollero, Muñoz, Segura y Arrillaga (2010) observaron, en *Nerium olander* L., la presencia de brotes axilares en explantes de yemas desarrollados en medio de cultivo, agregando una combinación de BA y potasio. Por su parte, Uribe y Cifuentes (2004) desarrollaron plántulas de *Legrandia concinna* a partir de explantes de yemas axilares, desarrollados en un medio con la combinación hormonal de 0.1 y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de AIB y BA, respectivamente. En el presente estudio se ha evidenciado el efecto de la combinación de auxinas y citocininas en diferentes concentraciones en el medio de cultivo, sobre la iniciación de explantes de yemas. Cuando estas hormonas se han aplicado de manera separada, la respuesta de explantes tratados también ha sido positiva (Hang et al., 2002; Labardi et al., 1995; Rugini & Muganu, 1998). Basado en esta evidencia, se asume que la respuesta potencial de un explante puede estar

the hormonal combination of 0.1 and 0.5 mg·L<sup>-1</sup> of AIB and BA, respectively. In the present study the effect of the combination of auxins and cytokinins has been demonstrated in different concentrations in the culture medium, on the initiation of explants of buds. When these hormones have been applied separately, the response of treated explants has also been positive (Hang et al., 2002; Labardi et al., 1995; Rugini & Muganu, 1998). Based on this evidence, it is assumed that the potential response of an explant may be associated with its age, as well as the nature, concentration, combination or separate action of the hormone.

#### Callogenesis in explants of embryo

The development of calluses in explants of embryos was affected by the concentration of TDZ in the culture medium. The best callogenic response expressed in fresh weight was induced by the concentration of 3 mg·L<sup>-1</sup> of TDZ (Figure 6). The level of calluses produced by the embryo under this concentration was higher than 60 %, observing this biomass in 58 % of the explants. A lower response was observed in explants developed in the medium with 1 and 10 mg·L<sup>-1</sup> of TDZ. In somatic embryogenesis, germination increases with the presence and concentration of different types of cytokinins in the medium. The effectiveness of the cytokinins

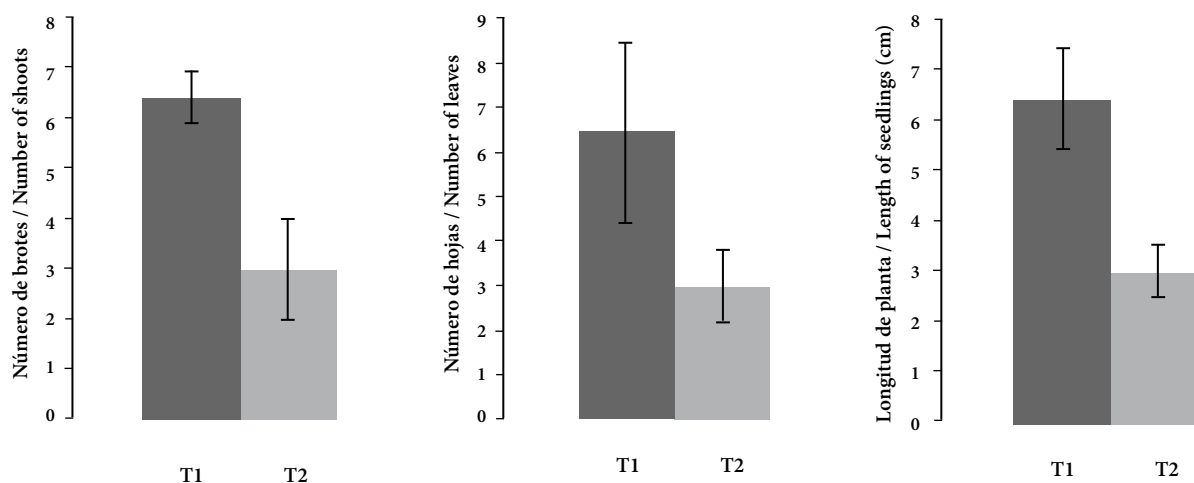


FIGURA 4. Número de brotes, número de hojas y longitud de plántulas desarrolladas en explantes de yemas cultivadas por 12 semanas en medio Murashige y Skoog, conteniendo auxinas y citocininas en diferentes concentraciones. T1: benziladenina (3.0  $\mu\text{M}$ ), kinetina (1.0  $\mu\text{M}$ ) y ácido naftalenacético (0.3  $\mu\text{M}$ ). T2: kinetina (3.0  $\mu\text{M}$ ), benziladenina (1.0  $\mu\text{M}$ ) y ácido indolbutírico (0.3  $\mu\text{M}$ ). Barras verticales representan el error típico.

FIGURE 4. Number of shoots, number of leaves and length of seedlings developed in explants of buds cultivated for 12 weeks in Murashige and Skoog culture medium, containing auxins and cytokinins in different concentrations. T1: benzyladenine (3.0  $\mu\text{M}$ ), kinetin (1.0  $\mu\text{M}$ ) and naphthalenetic acid (0.3  $\mu\text{M}$ ). T2: kinetin (3.0  $\mu\text{M}$ ), benzyladenine (1.0  $\mu\text{M}$ ) and indolebutyric acid (0.3  $\mu\text{M}$ ). Vertical bars represent the typical error.

asociada a su edad, así como a la naturaleza, la concentración, la combinación o la acción por separado de la hormona.

#### Calogénesis en explantes de embrión

El desarrollo de callos en explantes de embriones fue afectado por la concentración de TDZ en el medio de cultivo. La mejor respuesta calogénica expresada en peso fresco fue inducida por la concentración de 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ (Figura 6). El nivel de callosidad producida por el embrión bajo esta concentración fue mayor de 60 %, observándose esta biomasa en el 58 % de los explantes. Una menor respuesta se observó en explantes desarrollados en el medio con 1 y 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ. En la embriogénesis somática, la germinación incrementa con la presencia y concentración de citocininas de diferente tipo en el medio. La efectividad de las citocininas para promover organogénesis de embriones y cotiledones se ha documentado en especies como *P. pinaster* (Humanez, Blasco, Brisa, Segura, & Arrillaga, 2011) y *Cupressus sempervirens* (Labardi et al., 1995). El desarrollo embriogénico también ha sido favorecido con la adición de auxinas en el medio de cultivo en especies como *J. regia* (Long et al., 1995) y *C. illinoensis* (Rodríguez & Wetzstein, 1994), cuya formación de callos incrementa al aumentar la concentración de ANA y 2,4-D. Las concentraciones de 1 y 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ en el medio indujeron estructura calogénica compacta que sólo mostraron estructuras pre-embriónicas de tipo globular, mientras que la concentración de 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ indujo una estructura friable mostrando actividad embriogénica de tipo nodular, torpedo y corazón (Figura 7). Valderrama et al. (2008) observaron que los callos de tipo compacto de

to promote organogenesis of embryos and cotyledons has been documented in species such as *P. pinaster* (Humanez, Blasco, Brisa, Segura & Arrillaga, 2011) and *Cupressus sempervirens* (Labardi et al., 1995). Embryogenic development has also been favored with the addition of auxins in the culture medium in species such as *J. regia* (Long et al., 1995) and *C. illinoensis* (Rodríguez & Wetzstein, 1994), whose callus formation increments by increasing the concentration of ANA and 2,4-D. The concentrations of 1 and 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of TDZ in the medium induced compact callogenic structure that only presented globular pre-embryonic structures, while the concentration of 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of TDZ in the medium induced a friable structure presenting embryogenic activity that was nodular, torpedo and heart shaped (Figure 7). Valderrama et al. (2008) observed that the compact calluses of *Fragaria virginiana* did not induce embryogenic development. The authors add that the friable callus is soft and has a high regeneration capacity, which is fundamental for initiating embryogenic suspension. In the present study, the color yellow predominated in calluses developed in concentrations of 3 and 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of TDZ in the medium, whereas the concentration of 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of TDZ induced a higher sequence of white calluses. According to Valderrama et al. (2008), the color of callus is related to the type of explants or with embryogenic initiation.

#### CONCLUSIONS

The antioxidants activated carbon (1 %) and  $\text{AgNO}_3$  (1 %) reduced necrosis in the explants of leaves and buds. The light factor had no effect over this variable. The highest callo-

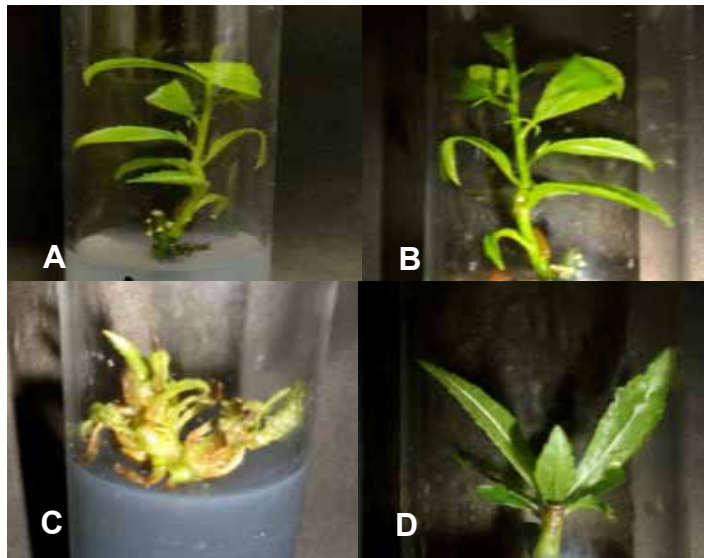


FIGURA 5. Brotación normal y múltiple en explantes de yemas cultivadas por 12 semanas en medio Murashige y Skoog con adición de auxinas y citocininas. A) Brotación normal (T1: benciladenina [3.0  $\mu$ M], kinetina [1.0  $\mu$ M] y ácido naftalenacético [0.3  $\mu$ M]); B) Brotación normal (T2: kinetina [3.0  $\mu$ M], benciladenina [1.0  $\mu$ M] y ácido indolbutírico [0.3  $\mu$ M]); C) Brotación múltiple (T1); D) Brotación múltiple (T2).

FIGURE 5. Standard and multiple sprouting in explants of buds cultivated for 12 weeks in Murashige and Skoog culture medium with addition of auxins and cytokinins. A) Standard sprouting (T1: benzyladenine [3.0  $\mu$ M], kinetin [1.0  $\mu$ M] and indole butyric acid [0.3  $\mu$ M]); B) Standard sprouting (T2: kinetin [3.0  $\mu$ M], benzyladenine [1.0  $\mu$ M] and indole butyric acid [0.3  $\mu$ M]); C) Multiple sprouting (T1); D) Multiple sprouting (T2).

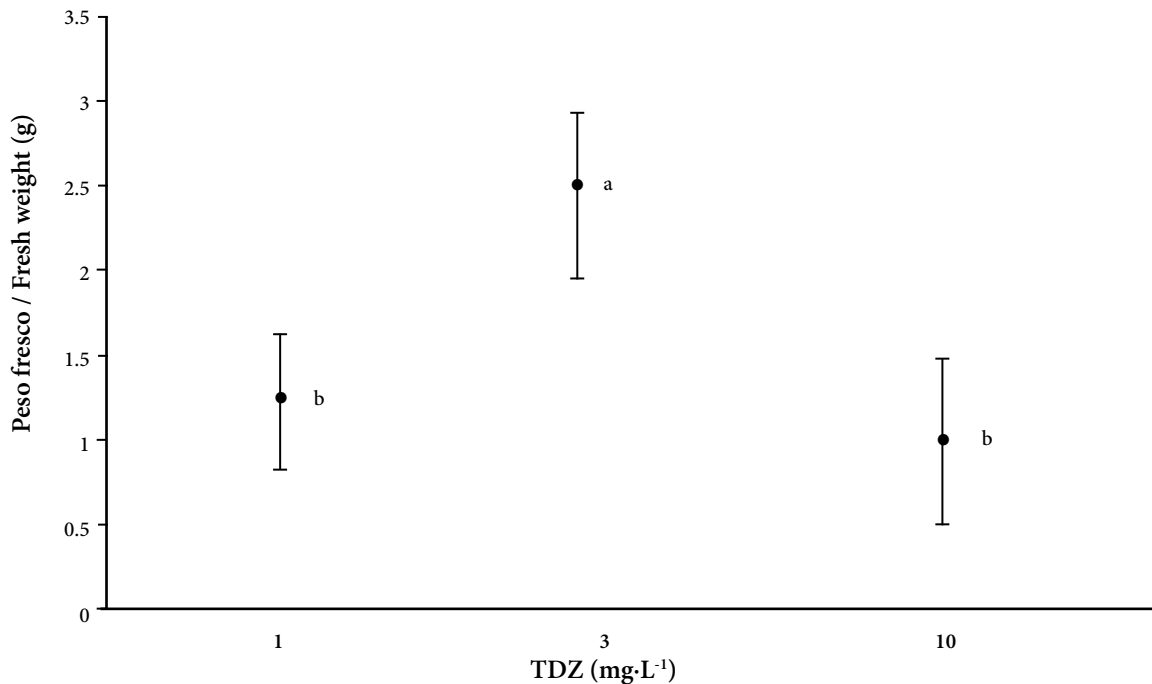


FIGURA 6. Peso fresco de callo en explantes de embriones cultivados en medio Murashige y Skoog con tiazurón (TDZ). Barras verticales representan el error típico de las medias (n = 12). Medias con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P = 0.05$ ).

FIGURE 6. Fresh weight of callus in explants cultivated in Murashige and Skoog culture medium with thidiazuron (TDZ) embryos. Vertical bars represent the standard error of means (n = 12). Means with dissimilar letters are statistically different (Tukey,  $P = 0.05$ ).

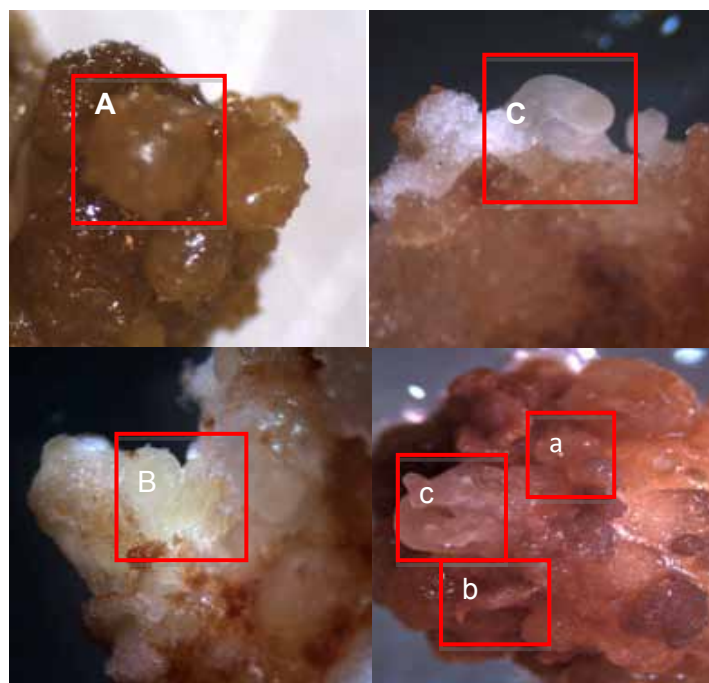


FIGURA 7. Estructura pre-embriónica de tipo globular (A), torpedo (B) y corazón (C) en callos de tipo friable, a partir de explantes de embriones iniciados en medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tiazurón, 12 semanas después de iniciado el cultivo. Las estructuras globular (a), torpedo (b) y corazón (c) se observan en un mismo callo.

FIGURE 7. Globular pre-embryonic structures (A), torpedo (B) and heart (C) shaped calluses with friable structure, from embryo explants initiated in Murashige and Skoog culture medium supplemented with  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of thidiazuron, 12 weeks after initiating the culture. The globular (a), torpedo (b) and heart (c) structures are seen in the same callus.

*Fragaria virginiana* no indujeron desarrollo embriónico. Los autores agregan que el callo de tipo friable es blando y tiene alta capacidad de regeneración, la cual es fundamental para iniciar la suspensión embriónica. En el presente trabajo, el color amarillo predominó en callos desarrollados en concentraciones de 3 y  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ en el medio, mientras que la concentración de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ indujo una mayor secuencia de callos color blanco. Según Valderrama et al. (2008), el color del callo tiene relación con el tipo del explante o con la iniciación embriónica.

## CONCLUSIONES

Los antioxidantes carbón activado (1 %) y  $\text{AgNO}_3$  (1 %) redujeron el necrosamiento en los explantes de hojas y yemas. El factor luz no tuvo efecto sobre esta variable. La mayor producción callogénica en explantes de hojas se obtuvo con la adición al medio de 2,4-D en concentraciones de 1 y  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se observó mayor presencia de callos con estructura friable y de color blanco; sólo fueron obtenidos callos de tipo globular. La mayor respuesta callogénica en embriones se obtuvo en el medio que contenía  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ, encontrando presencia de callos con estructura friable de tipo globular, torpedo y corazón; no obstante, los callos con estructura compacta predominaron. La combinación de auxinas y citoquininas (KIN [ $3.0 \mu\text{M}$ ], BA [ $1.0 \mu\text{M}$ ], AIB [ $0.3 \mu\text{M}$ ]) indujeron mayor número de brotes, número de hojas y mayor longitud de brotes.

genic production in explants of leaves was obtained with the addition to the medium of 2,4-D in concentrations of 1 and  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . A higher presence of white calluses with friable structure was observed; only globular calluses were obtained. The highest callogenetic response in embryos was obtained in the medium that contained  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of TDZ, finding presence of globular, torpedo and heart shaped calluses with friable structure; however, the calluses with compact structure predominated. The combination of auxins and cytokinins (KIN [ $3.0 \mu\text{M}$ ], BA [ $1.0 \mu\text{M}$ ], AIB [ $0.3 \mu\text{M}$ ]) induced a higher number of shoots, leaves and longer shoots.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the scholarship awarded to carry out studies of Masters in Science through the Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de Maestría en Ciencias a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

## REFERENCIAS

- Aiiyu, O. (2005). Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. *African Journal of Biotechnology*, 4, 1485–1489. Obtenido de [http://academicjournals.org/article/article1382013749\\_Aliyu.pdf](http://academicjournals.org/article/article1382013749_Aliyu.pdf)
- Álvarez, J. M., Majada, J., & Ordás, R. J. (2009). An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons. *Forestry*, 86(2), 175–184. doi: 10.1093/forestry/cpn052
- De la Viña, G., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2001). Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 229–237. doi: 10.1023/a:1010675326271
- Huang, T., Shaolin, P., Gaofeng, D., & Lanying, Z. (2002). Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69 (2), 141–146. doi: 10.1023/a:1015223701161
- Humanez, A., Blasco, M., Brisa, C., Segura, J., & Arrillaga, I. (2011). Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of mediterranean provenances of maritime pine *Pinus pinaster*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 47(5), 569–577. doi: 10.1007/s11627-011-9397-9
- Kryvenki, M., Kosky, R. G., Guerrero, D., Domínguez, M., & Reyes, M. (2008). Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Bioteología Vegetal*, 8(2), 1609–1841.
- Labardi, M. I., Herry, I. S., Menabeni, D., Thorpe, T. A. (1995). Organogenesis and stomatic embryogenesis in *Cupressus sempervirens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 40, 179–182. doi: 10.1007/bf00037672
- Lelu-Walter, W. M., Bernier-Cardou, C. M., & Klimaszewska, K. (2006). Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Reproduction*, 25(8), 767–776. doi: 10.1007/s00299-006-0115-8
- Long, L. M., Preece, J. E., & Sambecck, J. W. (1995). Adventitious regeneration of *Juglans nigra* (eastern black walnut). *Plant Cell Reproduction*, 14, 799–803. doi: 10.1007/bf00232926
- Minitab Inc. (2009). *Minitab 16 statistical Software*. Pensilvania. USA.
- Moore, E. D., Williams, G. W., Palma, M. A., & Lombardini, L. (2009). Effectiveness of state level pecan promotion programs: The case of the Texas pecan checkoff program. *HortScience*, 44, 1914–1920. Obtenido de <http://hortsci.ashspublications.org/content/44/7/1914.full.pdf+html>
- Mulwa, R. M., & Bhalla, P. L. (2006). *In vitro* plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson). *Plant Cell Reproduction*, 25, 1281–1286. doi: 10.1007/s00299-006-0182-x
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nomura, K., Matsumoto, S., Masuda, K., & Inoue, M. (1998). Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26. *Plant Cell Reproduction*, 17, 597–600. doi: 10.1007/s002990050449
- Ollero, J., Muñoz, J., Segura, J., & Arrillaga, I. (2010). Micropropagation of oleander (*Nerium oleander* L.). *HortScience*, 45(1), 98–102. Obtenido de <http://hortsci.ashspublications.org/content/45/1/98.full.pdf+html>
- Percy, R. E., Klimaszewska, K., & Cyr, D. R. (2000). Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Canadian Journal of Forestry Research*, 30, 1867–1876. doi: 10.1139/x00-115
- Poornima, G. N., & Ravishankar, R. V. (2007). *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *Journal of Biotechnology*, 6(20), 2348–2352. Obtenido de <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58043>
- Rodríguez, A. P., & Wetzstein, H. Y. (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) subsequent conversion in plants. *Plant Cell Reproduction*, 13, 607–611. doi: 10.1007/bf00232930
- Ruginy, E., & Muganu, M. (1998). A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple (*Malus domestica*) cv. Golden Delicious. *Plant Cell Reproduction*, 17, 581–585.
- Salvi, N. D., Singh, H., Tivarekar, S., & Eapen, S. (2001). Plant regeneration from different explants of neem. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 65, 159–162. doi: 10.1023/a:1010672809141
- Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panestos, K., & Moulalis, D. (1998). Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). *Journal Silvae Genetica*, 46(6), 326–332. Obtenido de [http://www.rheinischesmuseumfuerphilologie.de/fileadmin/content/dokument/archiv/silvaeogenetica/46\\_1997/46-6-326.pdf](http://www.rheinischesmuseumfuerphilologie.de/fileadmin/content/dokument/archiv/silvaeogenetica/46_1997/46-6-326.pdf)
- SPSS Inc. (2009). *PASW Statistics*. Chicago IL.
- Tavakkol, R., Angoshtari, R., & Kalantari, S. (2011). Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omic Journal*, 4(2), 60–67. Obtenido de [http://www.pomics.com/tavakkol\\_4\\_2\\_2011\\_60\\_67.pdf](http://www.pomics.com/tavakkol_4_2_2011_60_67.pdf)
- Thompson, T. E., & Grauke, L. J. (2012). 'Lipan' Pecan. *HortScience*, 47, 121–123.
- Uribe, M., & Cifuentes, L. (2004). Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque*, 25(1), 717–724. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173114404012>
- Valderrama, S., Chico, J., Tejada, J., & Vega, A. (2008). Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa, *Fragaria virginiana*, utilizando ANA y BAP. *Rebiol*, 28(2), 346–351.
- Vieitez, A. M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J., & Ibarra, M. (2009). *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98, 135–145. doi: 10.1007/s11240-009-9546-6