



Interciencia

ISSN: 0378-1844

interciencia@ivic.ve

Asociación Interciencia

Venezuela

Gómez, Cristian; Uribe, Matilde; Ríos, Darcy; Sánchez-Olate, Manuel  
Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* labill.

Interciencia, vol. 31, núm. 10, octubre, 2006, pp. 734-738

Asociación Interciencia

Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33912106>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN *Eucalyptus*

### *globulus* LABILL.

Cristian Gómez, Matilde Uribe, Darcy Ríos y Manuel Sánchez-Olate

#### RESUMEN

Se estudió la inducción de callo embriogénico a partir de tres explantos provenientes de semillas maduras (embriones cigóticos maduros, hipocótilos y cotiledones). Los resultados indicaron que el medio I3 (B5 + ANA 0,5mg·l<sup>-1</sup> + BAP 1,0mg·l<sup>-1</sup>) produjo los mayores porcentajes de formación de callo en todos los explantes. La micromorfología evidenció presencia de células embriogénicas en todos los explantes, pero en hipocótilos y cotiledones se encontraron estados globulares en fases

iniciales. Posteriormente, en la fase de diferenciación, se obtuvo como máximo 25 estados globulares por callo reactivo, en un medio B5 suplementado con maltosa (2% p/v) al utilizar embriones cigóticos maduros. El estudio histológico indicó una diferenciación interna de los estados globulares, caracterizada por una formación concéntrica de haces vasculares, células de tipo parenquimático hacia la periferia y finalmente una protodermis, formada por células isodiamétricas.

#### SUMMARY

Embryogenic callus induction starting from three explants coming from mature seeds (mature zygotic embryos, hypocotils and cotyledons) was studied. The results indicated that the medium I3 (B5 + ANA 0.5mg·l<sup>-1</sup> + BAP 1.0mg·l<sup>-1</sup>) produced the largest percentages of callus formation in all the explants. Micromorphology revealed the presence of embryogenic cells in all explants, while globular states in initial phases were found in

hypocotils and cotyledons. Later, in the differentiation phase, a maximum of 25 globular states by callus were obtained in a B5 medium with maltose (2% p/v) added, when using mature zygotic embryos. The histological study showed internal differentiation of globular states, characterized by a concentric formation of vascular bundles, parenchymatous cells towards the periphery and, finally, a protodermis formed by isodiametrical cells.

#### Introducción

Los primeros reportes de inducción embriogénica en *Eucalyptus* sp. son los de Muralidharan y Mascarenhas (1987) y Muralidharan *et al.* (1989), quienes a partir de embriones cigóticos maduros de *E. citriodora* lograron inducir la formación de embriones somáticos en un medio B5 (solución mineral; Gamborg *et al.*, 1968) suplementado principalmente con glutamina, caseína hidrolizada y 5mg·l<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA). Si bien son los primeros reportes de embriogénesis somática en *Eucalyptus*, los autores lograron germinar los embriones somáticos y obtener plántulas. Incluso el callo em-

bríogénico se pudo subcultivar por 9 meses sin perder su potencial embriogénico. Estudios posteriores como los de Watt *et al.* (1991) en *E. grandis*, indicaron la posibilidad de obtener embriones somáticos desde hojas de plántulas micropropagadas, pero en bajas tasas (30%) y con problemas de asincronía en el proceso de germinación.

Estudios en *E. dunnii* (Termignoni *et al.*, 1996) a partir de semillas completas y en *E. nitens* (Ruaud *et al.*, 1997) también evidenciaron bajas tasas de formación de embriones, además de oxidación de los callos durante la etapa de proliferación. Sin embargo, estos últimos autores indicaron que es posible la inducción de

embriones somáticos desde hipocótilos, cotiledones, hojas y epicótilos, pero solo observaron la formación de estados globulares. El desarrollo de los diferentes estados del embrión somático también difiere en los estudios, ya que mientras Trindade y Pais (1999) describieron solamente la formación de estados globulares en *E. globulus*, Nugent *et al.* (2001) reportaron la formación de todos los estados de desarrollo. Además estos últimos autores, señalaron la formación de embriones somáticos anormales, es decir, con presencia de cotiledones fusionados en forma de anillo.

La inducción embriogénica también fue reportada en trabajos de caulogénesis indirecta en

*E. nitens*, aunque su frecuencia es muy baja y está condicionada por los tipos de explanto inicial y las condiciones de cultivo, principalmente combinaciones hormonales (Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Por otra parte, Bandyopadhyay y Hamill (2000) en un estudio comparativo entre embriones cigóticos y somáticos de *E. nitens*, encontraron que los embriones somáticos son más pequeños que los cigóticos. Secciones longitudinales de los embriones somáticos demostraron que se trataba de una estructura bipolar completamente encerrada en una cubierta translúcida y estratificada, sin encontrar diferencias en su morfología interna y organización celular con respecto a embriones cigóticos.

**PALABRAS CLAVE / Embriogénesis Somática / Embriones Somáticos / Estados Globulares / *Eucalyptus globulus* /**

Recibido: 06/09/2005. Modificado: 29/08/2006. Aceptado: 06/09/2006.

Cristian Gómez. Magíster y Doctor (c) en Ciencias Forestales Universidad de Concepción (UDEC), Chile. Especialista en Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología UDEC. Dirección: Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Casilla 160-C, Concepción, Chile. e-mail: crigomez@udec.cl

Matilde Uribe. Doctora en Biología, especialidad Biotecnología Vegetal, Universidad de Oviedo, España. Profesora Facultad de Ciencias Forestales, Centro de Biotecnología UDEC, Chile. e-mail: muribe@udec.cl

Darcy Ríos. Doctora en Biología, Universidad de Oviedo, España. Profesora Facultad de Ciencias Forestales. Investigadora Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología UDEC, Chile. e-mail: dríos@udec.cl

Manuel Sánchez-Olate. Doctor en Biología, Universidad de Oviedo, España. Director de Tesis. Facultad de Ciencias Forestales. Director Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Victoria 631, Casilla 160-C, Concepción, Chile. e-mail: msanche@udec.cl

## RESUMO

Estudou-se a indução de calo embriogênico a partir de três explantes provenientes de sementes maduras (embriões zigóticos maduros, hipocótilos e cotilédones). Os resultados indicaram que o meio I3 (B5 + ANA  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + BAP  $1,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) produziu as maiores porcentagens de formação de calo em todos os explantes. A micromorfologia evidenciou presença de células embriogênicas em todos os explantes, mas em hipocótilos e cotilédones se encontraram estados globulares em fases ini-

ciais. Posteriormente, na fase de diferenciação, se obteve como máximo 25 estados globulares por calo reativo, em um meio B5 suplementado com maltose (2% p/v) ao utilizar embriões zigóticos maduros. O estudo histológico indicou uma diferenciação interna dos estados globulares, caracterizada por uma formação concêntrica de feixes vasculares, células de tipo parenquimático na área periférica e finalmente uma protoderme, formada por células isodiamétricas.

Por otra parte, Pinto *et al.* (2002) al utilizar material de embriones cigóticos maduros, lograron la inducción y finalmente la conversión de embriones somáticos a plántulas, con un 21% de éxito. Estos autores establecieron, que la adición de suplementos nitrogenados, como caseína hidrolizada y glutamina, utilizados en otras experiencias para favorecer la inducción embriogénica, en este caso, estimulan la formación de raíces y la formación de embriones somáticos anormales. Estas anomalías ya descritas por Nugent *et al.* (2001), fueron desde 61% a 100% en los tratamientos inductores. Finalmente, en un estudio comparativo entre embriones somáticos y cigóticos con respecto a su contenido de material genético a través de citometría de flujo, Pinto *et al.* (2004) no encontraron diferencias significativas entre ambos, lo que estaría indicando, que la embriogénesis somática, es una técnica eficiente para la propagación de genotipos selectos.

En general, todos los estudios logran la inducción embriogénica desde embriones cigóticos. Los autores concuerdan en que las especies del género *Eucalyptus* son difíciles de estudiar por el bajo potencial embriogénico y lo complicado de obtener plántulas.

El objetivo de esta investigación es estudiar la inducción embriogénica a partir de tres tipos de explantes provenientes de embriones cigóticos maduros (embriones cigóticos completos, hipocótilos y cotilédones), así como los requerimientos nutricionales y hormonales implicados en la inducción y diferenciación de estados embriogénicos.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Eucalyptus globulus* Labill. donadas por el Instituto Forestal de Chile (INFOR) sede Concepción, procedentes de la Prueba de Progenies de San Agustín en Cauquenes (cosecha temporada 98/99). Las semillas fueron desinfectadas con alcohol al 70% (v/v) por 1min, hipoclorito de sodio comercial al 50% v/v (Clorox®) más una gota de Quix®, por 20min, seguido por 3 lavados con agua destilada estéril de 1, 2 y 3min de duración. Todo el proceso anterior se realizó bajo cámara de flujo laminar.

### Germinación de embriones cigóticos

La mitad de las semillas se cultivó en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con los macronutrientes diluidos  $\frac{1}{4}$ , sin hormonas, 3% (p/v) de sacarosa y 0,7% (p/v) de Agar (Merck), durante 21 días en oscuridad a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Una vez germinadas se escindieron los cotilédones e hipocótilos. Estos explantes se depositaron en placas de petri de vidrio de 9cm de diámetro con 20ml de los medios de inducción y selladas con parafilm. Por cada placa se instalaron 10 explantes, con 5 repeticiones por tratamiento y se mantuvieron en oscuridad continua a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 90 días. Todos los medios utilizados se esterilizaron en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  (1 atm) por 20min.

### Medios de inducción

Para la inducción de calo embriogénico se implementa-

ron 6 tratamientos empleando los medios II al I6, suplementados con las auxinas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA), y las citoquininas 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (Kin), de la manera siguiente:

II: B5 (Gamborg *et al.*, 1968) sin hormonas (Control 1)

I2: B5 + 2,4-D  $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + BAP  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

I3: B5 + ANA  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + BAP  $1,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

I4: B5 + 2,4-D  $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + Kin  $1,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

I5: MS (Murashige y Skoog, 1962) sin hormonas (Control 2)

I6: MS + 2,4-D  $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + BAP  $0,50\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

### Medios de proliferación

Los callos formados en los distintos tratamientos se repicaron a medios de proliferación consistentes en los constituyentes minerales respectivos para B5 y MS, por 30 días. Después de este período, los callos se transfirieron a medios de cultivo suplementados con  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BAP. Los cultivos fueron llevados a condiciones de oscuridad a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### Medios de diferenciación

Aquellos callos que presentaban características embriogénicas fueron depositados en placas de petri (6 callos/placa) con 20ml de los siguientes medios de diferenciación:

D1: B5 sin hormonas + sacarosa 2% (p/v)

D2: B5 sin hormonas + maltosa 2% (p/v)

Para ambos tratamientos (D1 y D2) los cultivos fueron mantenidos durante 60 días en cámara de incubación a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  con fotoperíodo de 16h luz con luz fría (Tubos Philips TLD 36W/54) y

bajo un flujo de fotones de  $80\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### Estudio morfológico e histológico

Después de la inducción se efectuaron análisis macromorfológicos que incluyeron aspec-

tos tales como textura, color y friabilidad de los callos. Para el análisis micromorfológico se realizaron disgregaciones-frotis a partir de pequeñas porciones de calo (2-3mm). Las muestras seleccionadas fueron teñidas con orceína aceto-láctica 2% (p/v), siguiendo la metodología descrita por Álvarez (1996). Finalmente, la observación de la preparación al microscopio óptico permitió determinar la existencia de células embriogénicas, no embriogénicas y estados embriogénicos en fases iniciales.

El estudio histológico se realizó en callos que presentaron estados globulares (EG). Para ello, porciones de calo (5-6mm) fueron incluidas durante 7 días en FAA (formaldehído, alcohol 70% y ácido acético glacial), para posteriormente deshidratarlas mediante una serie creciente de

alcoholes e incluirlas en parafina líquida. Se hicieron cortes de  $15\mu\text{m}$  con un micrótopo de rotación Microm HM 315 y teñidos con safranina acuosa 1% (p/v) y Fast Green 0,5% (p/v), ambos de Merck.

## Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistica 6.0. Como unidad experimental, para la fase de inducción se consideró cada placa petri con 10 explantes repetido 10 veces por cada tratamiento. Para la fase de diferenciación se consideró como unidad experimental cada placa petri con 6 callos repetidos 6 veces por tratamiento. Se aplicó un ANDE-VA no paramétrico mediante la prueba Kruskal-Wallis y se utilizó el test de Dunn con un nivel de significancia del 5%, para las comparaciones múltiples.

## Resultados y Discusión

### Inducción callogénica

#### Aspectos cuantitativos y macromorfológicos

A pesar que no hubo diferencias significativas entre los tipos de explante dentro de cada tratamiento, los mejores resultados de inducción callogénica se obtuvieron con el tratamiento I4 (Figura 1). Los explantes más reactivos fueron los embriones cigóticos maduros, ya que en los medios ensayados la formación de callo a partir de estos explantes fue superior al 80%.

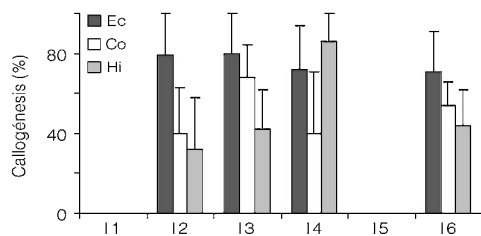


Figura 1. Respuestas callogénicas (%) para los diferentes medios de inducción y tipos de explantes Ec: Embrión cigótico maduro, Co: Cotiledones, Hi: Hipocótilos, I1 - I6: Medios de inducción callogénica. Sobre las barras se indica la desviación estándar. No existen diferencias significativas (Dunn,  $\alpha = 0,05$ ) para los tres tipos de explantes dentro de cada tratamiento. n = 100.

Los cotiledones alcanzaron un máximo de 68% de callogénesis en medio I3 y un mínimo de 40% en los medios I2 e I4. Los hipocótilos, en cambio, alcanzaron un porcentaje de un 32% en I2, hasta 86%

de callogénesis en I4. En el medio I3 los callos formados presentaron rutas morfogénicas dirigidas principalmente hacia caulogénesis y rizogénesis, situación descrita en otros reportes, y que posteriormente produce una reducida tasa de producción de callo embrionico (Termignoni *et al.*, 1996; Trindade y Pais, 1999; Nugent *et al.*, 2001).

Por otra parte, los controles (I1 e I5) no arrojaron respuestas callogénicas en ningún tipo de explante (Figura 1) y las respuestas organogénicas observadas corresponden a la germinación de los embriones cigóticos.

Los callos procedentes de los diferentes explantes utilizados y diferentes medios de cultivos presentaron diferencias morfológicas evidentes. Los callos inducidos en los medios I2 e I4 se presentaron translúcidos, friables y de color amarillo a café, características que se han atribuido a comportamiento embrionico en especies leñosas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los callos que expresaron respuestas organogénicas eran compactos y presentaron oxidación, característica de la callogénesis en *Eucalyptus* (Termignoni *et al.*, 1996). Si bien este tipo de respuesta no es deseada cuando se quiere inducir la formación de embriones somáticos, es posible utilizar y propagar este tipo de callos para estudiar la propagación de *Eucalyptus* a través de organogénesis indirecta (Watt *et al.*, 1991; Hervé *et al.*, 2001).

En I2 los callos formados a partir de embriones cigóticos maduros (Figura 2a) comenzaron su formación después de 14 días en el medio inductor. Durante las primeras etapas de la inducción, se observó la formación de pelos radi-

culares a partir de la zona de la futura radícula, y posteriormente la masa callosa se forma desde los cotiledones y en menor grado de los ejes embrionarios.

Los callos que se formaron desde cotiledones en los medios I3 e I4 eran compactos, oscuros y también presentaron rizogénesis adventicia. Parte de la masa callosa mantuvo el color verde de los cotiledones hasta el final del periodo de inducción. La mayor proporción de callogénesis con características embrionicas se obtuvieron en los medios I2 e I6, donde los agregados de callos alcanzaron un diámetro promedio de 1,5cm. Eran de color amarillo, friables y no presentaron oxidación ni rizogénesis adventicia (Figura 2b).

Para el caso de los hipocótilos, solo en el medio I3 el desarrollo de los callos no alcanzó un tamaño significativo al término del periodo de inducción (diámetro <1,5cm), presentando un aspecto compacto y con

respuestas organogénicas. En los otros medios de inducción, los hipocótilos originaron callo desde las zonas de corte y también desde el centro del hipocótilo. Los callos formados eran friables, translúcidos, de color amarillo a café, con ausencia de oxidación y rizogénesis adventicia (Figura 2c).

### Aspectos micromorfológicos

En hipocótilos cultivados en medios I2 e I6 y en cotiledones cultivados en medio I2, se obtuvieron fases iniciales de formación de estados globulares (EG) provenientes de células con competencia embrionica para responder al estímulo hormonal, tal como fuera observado en *E. grandis* por Watt *et al.* (1991). Estas células son generalmente de tipo meristemático o algunas parenquimáticas capaces de desdiferenciarse. Las células embrionicas muestran una serie de características comunes, típicas de las células en

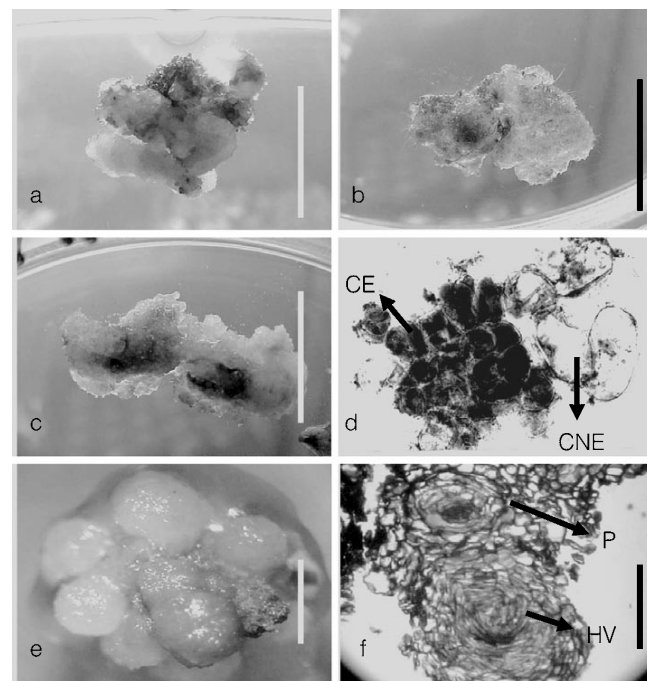


Figura 2. Aspectos macromorfológicos, micromorfológicos e histológicos de la inducción y diferenciación embrionica. a: Callo formado desde embrión cigótico maduro en medio I2; b: Callo formado desde cotiledones en medio I2; c: Callo formado desde hipocótilos en medio I4; d: Fotomicrografía de callo formado de cotiledones en medio I2 (x400), donde CE: Células embrionicas, y CNE: células no embrionicas; e: Diferenciación de EG en medio D2 (B5 + maltosa) desde callo formado de embriones cigóticos maduros en medio I2; f: Corte transversal de dos EG formados en medio D2. P: Protodermis HV: Haces vasculares. Las barras en a, b y c representan 1cm. Las barras en d y f representan 1mm.

proceso de división rápida, tales como tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo y nucléolos grandes, vacuolas pequeñas y gran cantidad de granos de almidón (Figura 2d). En especies ornamentales (Radojevic *et al.*, 1979), en la inducción embriogénica de *E. grandis* (Watt *et al.*, 1991) y *E. nitens* (Bandyopadhyay y Hamill, 2000) estas características se han observado en células individuales y grupos de células que dan origen a los embriones somáticos. En general, se concuerda que la embriogénesis somática directa se origina desde células altamente competentes, las cuales forman inmediatamente embriones somáticos, mientras que la embriogénesis somática indirecta se origina desde células que deben dediferenciarse para que adquieran la competencia embriogénica (Ahuja, 1993).

En el presente estudio las células embriogénicas se observaron en todos los explantes al final del período de inducción, pero la formación de EG fue más notoria en cotiledones e hipocótilos, lo que induce a pensar, que en este tipo de explante el inicio de los EG transcurre en menor tiempo debido a la presencia de células altamente competentes, aunque no queda claro si el origen de los EG es uni o multicelular.

En *Coffea arabica* (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002) las células que originan los embriones somáticos presentan las mismas características observadas en este estudio. Sin embargo, estos autores concuerdan en un origen unicelular tanto para la embriogénesis somática directa como indirecta.

Por otra parte, la formación de los EG es similar a la formación de nuevos brotes adventicios. Azmi *et al.*, (1997) describieron el origen de brotes de *E. globulus* a partir de un grupo meristemático de forma tetraédrica ubicado en las proximidades de glándulas de aceite. Esta zona, altamente competente, se diferencia directamente en brotes al ser estimulado principalmente con BA, como también ha

sido descrito por Trindade y Pais (1999). De igual manera, en la organogénesis de *E. gunni* (Hervé *et al.*, 2001) se describe el origen de brotes adventicios a partir de ciertas células con alto contenido de clorofila, ubicadas en capas subepidérmicas, al utilizar nudos y entrenudos, mientras que al utilizar hojas, la neoformación implica participación del sistema vascular.

### Proliferación y diferenciación

Durante la fase de proliferación todos los callos mantuvieron las características macromorfológicas descritas para la inducción callogénica respecto a su morfología externa, pero se registraron diferencias con respecto a la tasa de proliferación. En general, los callos que provenían de embriones cigóticos maduros e hipocótilos, crecieron más rápido con respecto a aquellos obtenidos de cotiledones.

### Aspectos micromorfológicos

Después de 14 días de establecidos los tratamientos de diferenciación (D1 y D2), en todos los tipos de callos se observaron zonas con pigmentación roja atribuible a la síntesis de pigmentos antocianos, lo cual solo sucede en condiciones de luz. Los primeros autores en describir esta característica, que es propia de la embriogénesis somática de *Eucalyptus*, fueron Muralidharan *et al.* (1989) a partir de callos provenientes de semillas de *E. citriodora*. Ellos indicaron que es posible visualizar la presencia de los embriones somáticos por su coloración ("dark red"), pero no queda claro si aparece en los cultivos en oscuridad o a la luz. Esta duda también la reportaron Termignoni *et al.* (1996) ya que solamente observaron estas estructuras cuando los cultivos embriogénicos de *E. dunnii* fueron repicados a la luz, tal como sucedió en el presente estudio; además se constató que el crecimiento y diferenciación de

los EG procede de estas zonas pigmentadas.

Los EG presentaron una generación progresiva de células formando un macizo de estructura globular integrado (Figura 2e). Se caracterizan por su aspecto esférico y existencia de protodermis. Algunos EG más desarrollados presentaron diferenciación interna de estructuras vasculares y una marcada polaridad. Al final del período de inducción, los EG en fases iniciales se obtuvieron principalmente al utilizar cotiledones e hipocótilos como explantes iniciales, lo que indica una mayor competencia embriogénica de este tipo de material.

La diferenciación de los EG se produjo desde la superficie y el interior de la masa callosa, lo cual se constató en los cortes histológicos. Inicialmente presentaron una protodermis delgada y transparente, formada por divisiones celulares anticlinales, que después de 60 días se tornó gruesa y opaca. Paralelamente se detectó una tendencia bipolar del crecimiento de los EG. Internamente (Figura 2f) se observó la formación de haces vasculares concéntricos en el centro de la estructura; hacia la periferia, la formación de una capa de células de tipo parenquimático derivada de divisiones celulares anticlinales y periclinales, y finalmente, una protodermis formada por una capa de células pequeñas e isodiamétricas. La formación de protodermis y tejido parenquimático también fue reportado por (Ruaud *et al.*, 1997), quienes realizaron estudios histológicos de em-

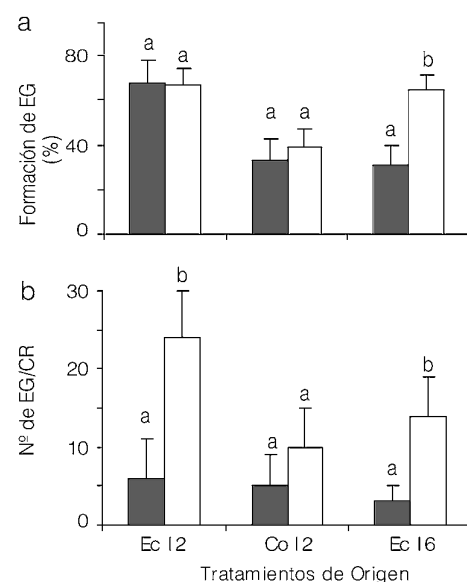


Figura 3. Aspectos cuantitativos de la diferenciación embriogénica. a: Porcentaje de formación de EG (%EG) en medio D1 (B5 + sacarosa 2% (p/v), barras negras) y D2 (B5 + maltosa 2% (p/v), barras blancas); b: Número de EG por callo reactivo en medio D1(B5 + sacarosa 2% (p/v), barras negras) y D2 (B5 + maltosa 2% (p/v), barras blancas). Sobre las barras se indica la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (Dunn,  $\alpha=0,05$ ) entre los medios de diferenciación dentro de cada tratamiento. n= 60.

briones somáticos de *E. nitens*, pero no mencionan formación de elementos vasculares.

De igual manera en la organogénesis de *E. gunni*, Hervé *et al.* (2001) describieron la diferenciación de brotes adventicios desde protuberancias meristemáticas, a través de una serie de divisiones periclinales y anticlinales. Pero a diferencia de los EG, estos nuevos brotes están ligados al tejido de origen y no pueden ser separados a menos que se destruya la organización tisular.

Durante la diferenciación se produjeron altas tasas de oxidación y necrosis, sobreviviendo los tratamientos que se muestran en la Figura 3. Aunque en forma general el efecto de la oxidación es negativo sobre la masa callosa, Bandyopadhyay y Hamill (2000) establecieron que favorece la diferenciación y el desarrollo de la cubierta epidérmica de los embriones somáticos.

La mayor formación de EG se observó en el medio D2 con cotiledones provenientes de medio I2 (39%) y en em-

briones cigóticos maduros provenientes de I2 e I6 (67%). Existiendo en este último se hallaron diferencias significativas (Figura 3a). Con respecto al cociente entre número de estados globulares por callo reactivo (EG/CR), hubo mejores resultados con D2 y diferencias significativas al utilizar embriones cigóticos maduros en I2 e I6 (Figura 3b). Los EG que se consideraron válidos fueron aquellos de diámetro mayor a 1mm y ubicados en la superficie de los callos.

La adición de maltosa fue positiva, tanto para el número como para el tamaño de los EG formados en los callos. Su efecto ha sido reportado por Trindade y Pais (1999), estableciéndose como una fuente de carbohidratos más adecuada que galactosa y sacarosa para el desarrollo de los embriones somáticos de *E. globulus*. En otras especies leñosas, tales como *Abies alba* (Hristoforoglu *et al.*, 1995) y *Abies nordmanniana* (Norgaard, 1997) este azúcar también induce un mayor desarrollo de embriones somáticos. En *Prunus avium* (Reidiboy-Talleux *et al.*, 1999) obtuvieron un aumento significativo de la maduración de embriones somáticos blancos al aplicar maltosa. Al respecto, los autores concuerdan en que la sacarosa es degradada a monosacáridos más rápidamente que la maltosa, produciendo hipoxia y acumulación de etanol en las células. El bajo metabolismo de maltosa mantendría una cierta concentración de oxígeno, la cual permite el desarrollo de los embriones somáticos, lo que también indican Fuentes *et al.* (2000) al analizar el efecto de diferentes fuentes de carbohidratos en la embriogénesis somática de *Coffea canephora*. Estos autores indican que maltosa es superior a sacarosa, fructosa y glucosa en cuanto al número de embriones somáticos por explante.

Blanc *et al.* (1999) formularon dos hipótesis para explicar el efecto beneficioso de la maltosa sobre la maduración de embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*, la primera asocia-

da a que la baja hidrólisis de la maltosa implicaría un descenso de los carbohidratos disponibles dentro de la célula, lo que permite una reorientación de programas de desarrollo a nivel genético, mientras que la segunda hipótesis establece que la propia molécula de maltosa tiene un efecto específico sobre la reorientación de estos programas.

A pesar de que externamente no se pudo diferenciar estados de corazón, torpedo y cotiledonar, las evidencias morfológicas observadas permiten afirmar que en el proceso de embriogénesis somática de *E. globulus*, estos estados embriogénicos avanzados están condicionados a los aportes hormonales, minerales, ambientales y al origen del material vegetal, ya que mientras algunos autores describen el desarrollo de todos los estados de desarrollo del embrión somático (Nugent *et al.*, 2001) otros solo describen formación de estados globulares (Trindade y Pais, 1999). Sin embargo, es probable que la forma y secuencia de aplicación de los tratamientos inductores también originen las diferencias señaladas, ya que ambos grupos de investigadores aplican tiempos de inducción diferentes.

## Conclusiones

Se estableció una forma indirecta de inducción de embriones somáticos de *E. globulus* mediante la formación previa de EG, siendo los embriones cigóticos maduros el tipo de explante con el que se obtiene mayores porcentajes de formación de callos en los tratamientos utilizados.

Los patrones de diferenciación histológica de los EG en son similares a los descritos para otras especies, y los aportes de maltosa fueron positivos para la diferenciación y el número de EG/CR al utilizar principalmente embriones cigóticos como explanto inicial.

## REFERENCIAS

Ahuja M (1993) Biotechnology and clonal forestry. En Ahuja M,

- Libby W (Eds.) *Clonal Forestry I: genetics and biotechnology*. Springer. Berlín, Alemania. pp. 135-144.
- Álvarez C (1996) *Aspectos macro-morfológicos y moleculares de la regeneración de microplantas a partir de embriones de Pinus nigra*. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 24 pp.
- Azmi A, Noin M, Landré P, Prouteau M, Boudet A, Chriqui D (1997) High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. Hypocotils: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 9-16.
- Bandyopadhyay S, Hamill JD (2000) Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. *Ann. Bot.* 86: 237-244.
- Bandyopadhyay S, Cane K, Rasmussen G, Hamill J (1999) Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. *Plant Sci.* 140: 189-198.
- Blanc G, Michaux-Ferrière N, Teisson C, Lardet L, Carron MP (1999) Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 59: 103-112.
- Fuentes S, Calheiros MB, Manetti-Filho J, Vieira LG (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 5-13.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Hervé P, Jauneaud A, Paques M, Marien J, Boudet A, Teulieres Ch (2001) A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunni* clone: comparative histology. *Plant Sci.* 161: 645-653.
- Hristoforoglu K, Schmidt J, Bolhar-Nordenkamp H (1995) Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40: 277-284.
- Muralidharan EM, Mascarenhas AF (1987) *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Reports* 6: 256-259.
- Muralidharan EM, Gupta PK, Mascarenhas AF (1989) Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Reports* 8: 41-43.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Norgaard J (1997) Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Sci.* 124: 211-221.
- Nugent G, Chandler S, Whiteman P, Stevenson T (2001) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 85-88.
- Pinto G, Santos C, Neves L, Araujo C (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports* 21: 208-213.
- Pinto G, Loureiro J, Lopes T, Santos C (2004) Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. *Theor. Appl. Genet.* 109: 580-587.
- Quiroz-Figueroa F, Fuentes-Cerda CF, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20: 1141-1149.
- Radojevic LJ (1979) Somatic embryogenesis and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa*. *Steud. Z. Pflanzenphysiol.* 91: 57-62.
- Reidiboy-Talleux L, Diemer F, Sourdioux M, Chapelain K, Grenier-De March G (1999) Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 199-209.
- Rodríguez R, Álvarez C, Centeno M, Berros B, Rodríguez A (2005) Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. En Sánchez M, Ríos D (Eds.) *Biología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Chile. pp. 63-67.
- Ruad J, Churchill K, Pepper S (1997) Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. *Acta Hort.* 447: 185-186.
- Termignoni R, Wang P, Hu ChY (1996) Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45: 129-132.
- Trindade H, Pais M (1999) Morphogenesis induction and somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. En *Proc. Cong. Int. Aplicación de la Biotecnología a la Genética Forestal*. Vitória-Gasteiz. España. pp. 189-193.
- Watt MP, Blakeway FC, Cresswell CF, Herman B (1991) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *South African Forestry J.* 157: 59-65.