

## EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDUCIDA CON ESTRÉS OSMÓTICO EN *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., ESPECIE RECALCITRANTE Y APOMÍCTICA

### INDUCED SOMATIC EMBRYOGENESIS UNDER OSMOTIC STRESS IN *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., A RECALCITRANT APOMIC TIC SPECIES

Álvaro Bernal-Flores, Adrián R. Quero-Carrillo\*, Alejandrina Robledo-Paz, H. Araceli Zavaleta-Mancera y Paulino Pérez-Rodríguez

Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 carr. México- Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

\*Autor de correspondencia (queroadrian@colpos.mx)

#### RESUMEN

En el presente estudio varios medios de cultivo con diferentes auxinas fueron establecidos para la regeneración de plantas normales en pasto Banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., a partir de callos inducidos en cariósides (explantes) maduros cultivados en medio MS basal suplementado con 2,4-ácido diclorofenoxiacético y varias citocininas. Los medios MS+2,4-D+BAP suplementados con sorbitol (MI-13, MI-14) dieron origen a callos con características morfológicas con potencial de regeneración. Los callos embriogénicos obtenidos a partir de MI-14 fueron colocados en diferentes medios de regeneración, entre los que MR-2 mostró la mayor frecuencia de regeneración (95.8 %) y eficiencia de conversión (13.9 %). Plántulas verdes, morfológicamente normales, fueron obtenidas con medio suplementado con cinetina (1 mg L<sup>-1</sup>), ácido naftalenacético (0.2 mg L<sup>-1</sup>) y ácido giberélico (0.2 mg L<sup>-1</sup>). El estrés osmótico y el balance hormonal resultante de la adición de sorbitol, estimuló la formación de proembrioides en callos friables y de embriones somáticos en pasto Banderita. Se presenta aquí el primer protocolo de regeneración en esta especie apomíctica recalcitrante, que pueda ser útil en trabajos futuros basados en técnicas de cultivo de tejidos.

**Palabras clave:** *Bouteloua curtipendula*, pasto Banderita, embriogénesis somática, regeneración de plantas, callos embriogénicos.

#### SUMMARY

Several basal MS culture media added with different auxins were tested on induced calli to promote normal plant regeneration, using mature Caryopsis of sideoats grama *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. as explants. The induction media was supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and several cytokinins. Basal MS + 2,4-D + BAP media supplemented with sorbitol (MI-13, MI-14) produced morphologically-viable regeneration calli. Potential highly embryogenic calli obtained from MI-14 were placed on different regeneration media. Medium MR-2 induced the highest plant regeneration frequency (95.8 %) as well as conversion efficiency (13.9 %). Green morphologically-normal plants were obtained on supplemented media added with kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>), naphthalenetic acid (0.2 mg L<sup>-1</sup>), and gibberellic acid (0.2 mg L<sup>-1</sup>). Osmotic stress or hormonal balance due to sorbitol addition produced pro-embryo within soft calli and induced somatic embryos in sideoats grama. This is the first report of a plant regeneration protocol for this apomictic species.

**Index words:** *Bouteloua curtipendula*, tissue culture, somatic embryogenesis, plant regeneration, embryogenic calli.

#### INTRODUCCIÓN

El pasto Banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., es una especie C<sub>4</sub>, apomíctica facultativa con genotipos diploides (2n = 2x = 20), poliploides (2n = 4x, 5x, ...10x) y aneuploides (Gould, 1979; Morales *et al.*, 2006; Quero *et al.*, 2010), nativa de zonas áridas y semiáridas del norte de México, país considerado centro de origen de esta especie (Quero, 2001; Morales *et al.*, 2006). Su valor en la alimentación de herbívoros en pastoreo la hace de gran importancia forrajera. Su condición apomíctica ofrece ventajas que pueden ser aprovechadas en su mejoramiento genético, debido a que la apomixis preserva el genotipo maternal por partenogénesis, a la vez que mantiene las relaciones alélicas, fija la heterosis y las características de interés agronómico (Van Dick y Van Damme, 2000).

Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* han sido una herramienta valiosa para el desarrollo de protocolos de regeneración en especies forrajeras apomícticas; se han usado en programas de mejoramiento o transformación genética en especies como *B. gracilis* (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001), *B. eriopoda* (Osuna y Barrow, 2004), *Festuca alta* (*Arundinacea gigantea*; Chen *et al.*, 2004), *Brachiaria brizantha* (Cabral *et al.*, 2011), *Paspalum notatum* (Mancini *et al.*, 2014), *Eragrostis curvula* (Zappacosta *et al.*, 2014) y pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*; Carloni *et al.*, 2014).

Frecuentemente, los factores genotipo, medio de cultivo, fuente de auxinas, concentración (Rakshit *et al.*, 2010), tipo de explante y edad (Aina *et al.*, 2012), son considerados en la inducción de callos morfológicos para incrementar la respuesta de regeneración de plantas morfológicamente normales. Se ha reportado alta eficiencia en la inducción de callos en diferentes explantes en especies apomícticas, pero la capacidad de regeneración ha sido muy pobre (Hu *et al.*, 2006; Bernal-Flores *et al.*, 2013), capacidad que constituye la principal limitante para la obtención de protocolos eficientes de mejoramiento.

La baja respuesta de regeneración en especies apomícticas comparada con especies sexuales ha sido notable (Stephens *et al.*, 2006; Mancini *et al.*, 2014); aunque las causas no han sido bien entendidas en todas las especies, pudieran ser, principalmente debidas a desequilibrio hormonal endógeno (Huang *et al.*, 2012). En especies denominadas recalcitrantes, los tratamientos con estrés osmótico (Wei *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013), frío (Immonen y Anttila, 1999; Narusaka *et al.*, 2003), salinidad o adición de ABA (ácido abscísico; Narusaka *et al.*, 2003), han sido usados en diferentes especies para incrementar los porcentajes de regeneración o la expresión de genes.

La función del estrés osmótico comúnmente utilizado en varias especies, se relaciona con el incremento en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno), O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superóxido), O<sub>2</sub> (oxígeno "singlet") y radicales OH (hidroxilo), que incrementan la fuga de electrones en el oxígeno molecular (Xiong *et al.*, 2002), los cuales pueden alterar por oxidación el metabolismo normal de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Fridovich, 1986), aunque la mejor respuesta bioquímica es la acumulación de osmolitos orgánicos como prolina y betainas (McCue y Hanson, 1990).

En cambio, los niveles moderados de estrés incrementan el metabolismo e inducen mecanismos de adaptación (Lichtenthaler, 1998). Esta inducción caracterizada por reorganización celular, desencadena cambios fisiológicos, metabólicos y de expresión génica, en caso de que las señales apropiadas sean percibidas (Fehér *et al.*, 2003), que provocan des-diferenciación celular. El estrés osmótico moderado estimula la producción de hormonas endógenas (principalmente ABA) e incrementa la regeneración de callos (Huang *et al.*, 2012), debido a su función en la diferenciación celular (Park *et al.*, 2011). Por tanto, el objetivo fue evaluar diferentes reguladores de crecimiento para la producción de callos embriogénicos y la regeneración de plántulas viables en pasto Banderita.

## MATERIALES Y MÉTODOS

De un ecotipo apomíctico (2n = 4x = 40) de Banderita sobresaliente en la producción de forraje, se obtuvieron semillas (cariósides) maduras mediante eliminación manual de bráctas accesorias de la espiguilla; este material es originario de la evaluación de una colecta nacional (Morales *et al.*, 2006).

### Manejo experimental

**Desinfección de semilla.** Se hizo con solución de etanol a 70 % (v/v) por 2 min, colocadas en solución con dos fungicidas (Ridomil 3 mL L<sup>-1</sup> y Promyl 1 g L<sup>-1</sup>), durante 30 min en agitador; finalmente, fueron colocadas en solución con

cloro a 30 % (v/v), suplementada con dos gotas de jabón líquido por 30 min en agitador, y luego enjuagada cinco veces con agua esterilizada.

**Inducción de callos.** Los medios de inducción (MI) elaborados con las sales basales (Murashige y Skoog, 1962; MS), fueron suplementados con distintas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento (Cuadro 1). Tanto el ácido giberélico y thidiazurón fueron preparados en solución mediante etanol y NaOH 1N respectivamente, y posteriormente incorporados al medio de cultivo; finalmente el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1. Se colocaron cariósides maduras como explantes (40 por caja Petri), con 30 mL de cada medio de cultivo. Los callos obtenidos se cultivaron por ocho semanas antes de ser transferidos a medio de regeneración y sub-cultivados cada 20 d. Los explantes con pretratamiento de estrés osmótico provocado con D-sorbitol (Sigma® 8143) permanecieron 14 d en los medios MI-13 y MI-14; posteriormente, se transfirieron al mismo medio de inducción sin sorbitol y luego fueron sub-cultivados cada 20 d. Los callos fueron mantenidos en cámara de crecimiento a temperatura de 25 ± 2 °C, en obscuridad.

**Callos embriogénicos (CE).** Los callos obtenidos en MI-14 fueron subcultivados cada 15 d para rápida multiplicación y luego probados en cuatro medios de regeneración (MR-1, MR-2, MR-3, MR-4). Las masas proembriogénicas de callos fueron mantenidas en medio suplementado con cinetina (1 mg L<sup>-1</sup>), ácido naftalenacético (ANA, 0.3 mg L<sup>-1</sup>), ácido giberélico (AG<sub>3</sub>, 0.5 mg L<sup>-1</sup>) y ácido indolacético (AIA, 0.1 mg L<sup>-1</sup>).

**Regeneración de planta.** Callos jóvenes obtenidos de todos los medios de inducción (Cuadro 1) y menores a ocho semanas de edad, fueron colocados en cuatro medios de regeneración (MR-1, MR-2, MR-3, MR-4) preparados con el medio MS basal adicionado con cinetina o thidiazurón, ANA y AG<sub>3</sub>. Seis piezas de 1 g de callo suave (organogénico) y embriogénico (CE) se colocaron en cada medio de regeneración, y luego sub-cultivados cada 25 d. Los callos permanecieron 20 d y posteriormente fueron transferidos al medio de maduración y conversión (AG<sub>3</sub> 0.5 mg L<sup>-1</sup>). Las plántulas regeneradas normales fueron mantenidas por 20 d más en el mismo medio, y posteriormente fueron transferidas a medio de mantenimiento con MS<sub>30</sub> basal (2.2 g L<sup>-1</sup>), suplementado con sacarosa (10 g L<sup>-1</sup>). Las plántulas fueron cultivadas en cámara de crecimiento con 16 h luz e intensidad lumínica de 28 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

**Histología y microscopia electrónica de barrido.** Callos embriogénicos obtenidos del medio de maduración fueron fijados en FAA (10 % formaldehído, 5 % ácido acético, 52 % etanol, 33 % agua, v/v; Jensen, 1962), deshidratados en serie de alcoholes (etanol 30 %, etanol 40 %, etanol 50 %, etanol 60 %, etanol 70 %, etanol 80 %, etanol 90 %, etanol 100 %).

**Cuadro 1. Medios de inducción y regeneración usados en embriogénesis somática de *B. curtipendula*.**

Medio	Composición
<b>Medios de inducción</b>	
MI-1	MS+ 2,4- ácido diclorofenoxiacético (2, 4-D; 2 mg L <sup>-1</sup> ) + ác. indolacético (AIA) 0.2 mg L <sup>-1</sup>
MI-2	MS+ 2,4 -D 2 mg L <sup>-1</sup> + ácido naftalenacético (ANA) 0.25 mg L <sup>-1</sup>
MI-3	MS+ 0.5 mg 2,4-DL <sup>-1</sup> + cinetina 0.2 mg L <sup>-1</sup>
MI-4	MS+ 0.5 mg 2,4-DL <sup>-1</sup> + cinetina 0.4 mg L <sup>-1</sup>
MI-5	MS+ 2,4-D 1 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 0.2 mg L <sup>-1</sup>
MI-6	MS+ 2,4-D 1 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 0.4 mg L <sup>-1</sup>
MI-7	MS+ 2,4-D 2 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 0.2 mg L <sup>-1</sup>
MI-8	MS+ 2,4-D 2 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 0.4 mg L <sup>-1</sup>
MI-9	MS+ 2,4-D 3 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 0.2 mg L <sup>-1</sup>
MI-10	MS+ 2,4-D 3 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 0.4 mg L <sup>-1</sup>
MI-11	MS+ 2,4-D 1 mg L <sup>-1</sup> + cinetina 1 mg L <sup>-1</sup>
MI-12	MS+ 2,4-D 1 mg L <sup>-1</sup> + 6-bencilaminopurina (BAP) 0.2 mg L <sup>-1</sup> + AgNO <sub>3</sub> (3 mg L <sup>-1</sup> )
MI-13	MS+ 2,4-D 1 mg L <sup>-1</sup> + 6- BAP 0.2 mg L <sup>-1</sup> + sorbitol 0.6 mM + AgNO <sub>3</sub> (3 mg L <sup>-1</sup> )
MI-14	MS+ 2,4-D 2 mg L <sup>-1</sup> + 6- BAP 0.2 mg L <sup>-1</sup> + sorbitol 0.6 mM + AgNO <sub>3</sub> (3 mg L <sup>-1</sup> )
<b>Medios de regeneración</b>	
MR-1	MS + cinetina 1 mg L <sup>-1</sup> + ANA (0.1 mg L <sup>-1</sup> )+ác. giberélico (AG <sub>3</sub> ) 0.1 mg L <sup>-1</sup>
MR-2	MS + cinetina 1 mg L <sup>-1</sup> + ANA 0.2 mg L <sup>-1</sup> + AG <sub>3</sub> 0.2 mg L <sup>-1</sup>
MR-3	MS + cinetina 1 mg L <sup>-1</sup> + ANA 0.3 mg L <sup>-1</sup> + AG <sub>3</sub> 0.3 mg L <sup>-1</sup>
MR-4	MS + thidiazurón 1 mg L <sup>-1</sup> + ANA 0.1 mg L <sup>-1</sup>

Medios a base de MS basal (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 2 %, Phytigel 0.32 % y pH ajustado entre 5.7 - 5.8, con NaOH o HCl 1N. Medios colocados en autoclave durante 20 min.

etanol 70 %, etanol 85 %, etanol 100 % (1 y 2)) y xileno (alcohol etílico 50 % - xileno 50 % y xileno puro (1, 2, 3)), luego embebidos en parafina; los cortes se realizaron a 15 µm de grosor con micrótopo de rotación (American Optical®, modelo Spencer 820, USA).

Las muestras fueron luego desparafinadas con xileno (100 %), serie de alcoholes (etanol 50 %, etanol 70 %, etanol 85 %, etanol 100 %) y teñidas con *O*-safranina-verde fijo (Johansen, 1940), y después infiltradas y embebidas en resina sintética. Las muestras fueron observadas y las imágenes obtenidas en un microscopio Axiostar Plus Zeiss® (Carl Zeiss, Germany) provisto con cámara digital (Moticam 2000®, 2.0 MP).

Para microscopía electrónica de barrido, las muestras de CE fueron fijadas *in situ* con formaldehído a 3 % y deshidratadas en series de etanol (etanol 30 %, etanol 40 %, etanol 50 %, etanol 60 %, etanol 70 %, etanol 80 %, etanol 90 %, etanol 100 %) a intervalos de 40 min por solución. Las muestras fueron secadas a punto crítico con CO<sub>2</sub>, con un equipo Samdri® (modelo 780A; Tousimis, USA) y recubiertos con oro (ION SPUTTER, modelo JFC-1100®, USA), luego

analizadas y las respectivas imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM6390®, USA), operado a 5 KeV.

#### Análisis estadísticos

**Inducción de callos.** Los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión logística (Rencher y Schaalje, 2008), para modelar la probabilidad de inducción o no inducción de callos (*p*). Dado que la variable respuesta es binaria, se puede modelar como una variable aleatoria con distribución Bernoulli, con *p* como una función de los reguladores de crecimiento. El modelo de regresión logística aplicado es el siguiente (Agresti, 2002):

$$\log p/(1-p) = \beta_0 + \beta_1 D + \beta_2 K + \beta_3 B + \beta_4 S + \beta_5 D \times K + \beta_6 D \times B + \beta_7 D \times S + \beta_8 K \times B + \beta_9 K \times S + \beta_{10} B \times S$$

donde: *D*, *K*, *B* y *S* representan el contenido de ácido diclorofenoxiacético(2,4-D), cinetina, 6-bencilaminopurina y sorbitol, respectivamente. El modelo fue ajustado con el procedimiento PROC LOGISTICA, del paquete estadístico SAS 9.4 (SAS, 2004), para Windows.

**Regeneración de callos.** Los datos fueron analizados mediante regresión (Rencher y Schaalje, 2008) para determinar la tasa de regeneración de plantas en callos embriogénicos, con base en diferentes medios de regeneración (1 = MR-1, 2 = MR-2, 3 = MR-3, 4 = MR-4). El modelo aplicado fue el siguiente:

$$y_i = \text{Trat}_i + \varepsilon_i$$

donde:  $y_i$  = variable de respuesta medida en tratamiento  $i$ ;  $i$  = efecto del tratamiento (1, 2, 3, 4). Las diferencias entre tratamientos fueron probadas con la prueba de razón de verosimilitudes. Las comparaciones de medias se hicieron mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Medios de inducción y tipo de callo.** La formación de callos fue afectada significativamente ( $P \leq 0.05$ ) por el medio de cultivo y la concentración de los reguladores de crecimiento empleados. El origen y crecimiento de callos fue visible 2 semanas después de la incubación, iniciando en la región principal del vástago conforme la semilla germinó; se observó una relación entre germinación e inducción de callos. Similar a lo reportado en arroz (*Oryza sativa* L.) por Mirlohi *et al.*, (1989) y en *Panicum* spp., aquí se observó una correlación positiva entre germinación e inducción de callos por semilla (Seo *et al.*, 2008).

Los seis tipos de callo que fueron encontrados a partir de cariósides se ilustran en la Figura 1. Se observó mayor variabilidad de callos en medios suplementados con 6-bencilaminopurina (6-BAP; MI-12, MI-13, MI-14), comparados con los suplementados con cinetina, ácido indolacético (AIA) o ácido naftalenacético (ANA). Callos morfológicamente similares a los observados fueron reportados por Wang *et al.* (2010) para *Zoysia* spp. Los medios MI-12 y MI-14 mostraron los mayores porcentajes de inducción (66 y 66 %, respectivamente;  $P \leq 0.001$ ). El estrés osmótico inducido por el medio MI-14 estimuló la aparición de masas proembriogénicas de callos en el ecotipo apomíctico, y fueron fácilmente confirmados en el medio de regeneración (Cuadro 2).

Los callos embriogénicos (CE) obtenidos a partir de medios suplementados con sorbitol (0.6 mM), presentaron mayor frecuencia de inducción, comparado con medio suplementado con 6-BAP, sin sorbitol (MI-12). Similarmente a lo reportado en trigo, *Triticum aestivum* L. (Ul-Hassan *et al.*, 2009), los CE obtenidos mostraron coloración amarillo-pálida a blanca, de estructura compacta, con forma nódulo-globulares, y relativamente secos; en contraste, los callos no embriogénicos presentaron color amarillo-café, sin textura,

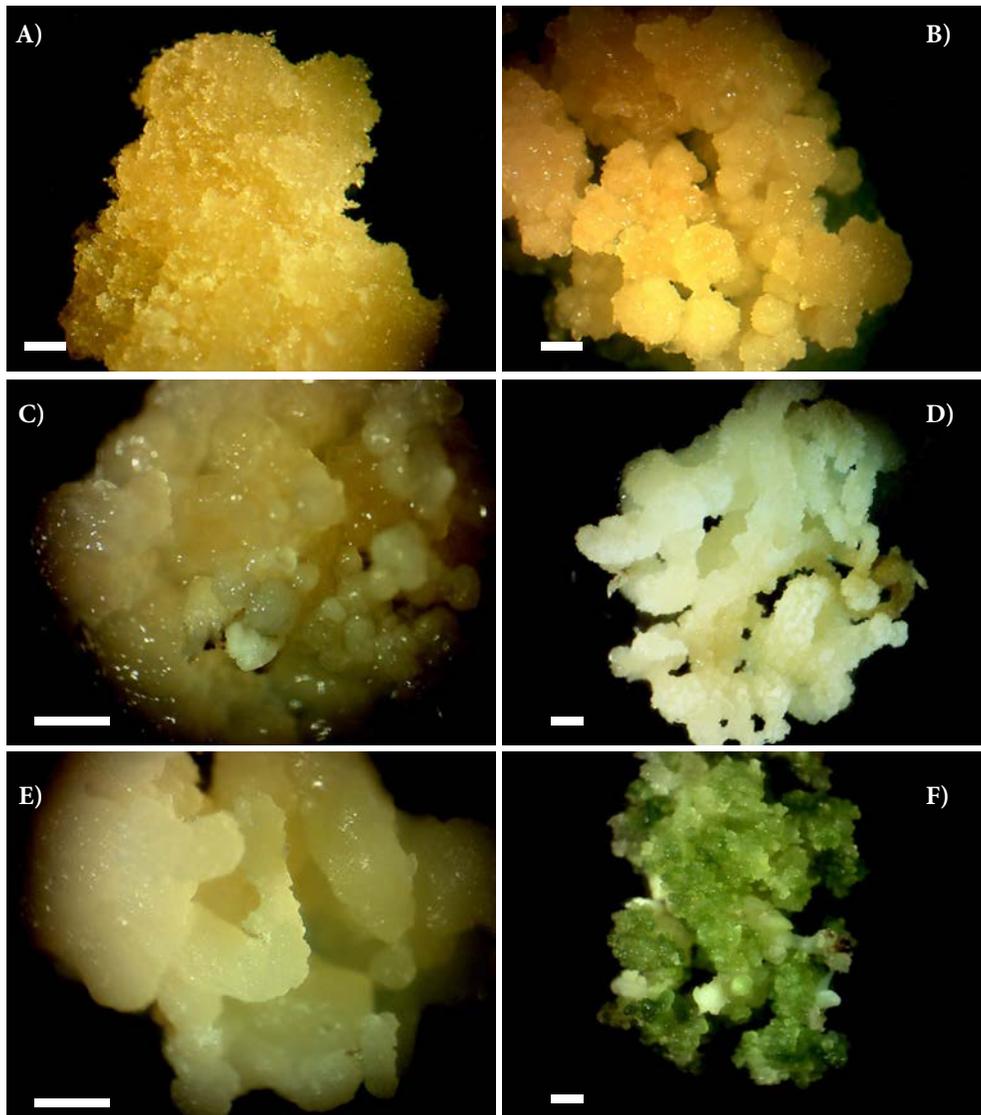
de forma irregular, acuosos en apariencia y de mayor desarrollo.

En la inducción de callos se detectaron mayores diferencias ( $\leq 0.0001$ ) para cinetina, y 6-BAP, mientras que hubo una menor respuesta con sorbitol ( $P > 0.05$ ), y no se observaron diferencias para 2,4-D. Las mejores respuestas en la inducción de callos fueron observadas en 2,4-D + 6-BAP y 2,4-D + sorbitol; además, se observaron interacciones significativas ( $P < 0.01$ ) en la variable de respuesta debida a los niveles evaluados (Cuadro 3).

**Embriogénesis somática.** Callos suaves y embriogénicos (Figuras 2A y 2B) fueron obtenidos en medio MI-13 y MI-14, mediante organogénesis indirecta y embriogénesis; en los callos embriogénicos se pudo observar a las fases propias de la embriogénesis somática en monocotiledóneas: globular, escutelar y coleoptilar. Las masas embriogénicas colocadas en medio de maduración estimularon su desarrollo a embriones somáticos y regeneración de plantas (Figuras 2C y 2D). La formación de pigmento clorofílico en callos embriogénicos fue observable cuando fueron colocados en los medios de regeneración, respuesta similar a la que se observó en *Zoysia* spp. (Wang *et al.*, 2010).

El pretratamiento de 14 d con sorbitol estimuló la aparición de callos con mejores características morfogénicas así como la sobrevivencia de células totipotentes y competentes, capaces de sobrevivir a tal efecto e inducir embriogénesis somática. Se detectaron embriones somáticos desarrollados de cariósides en *B. curtipendula*, que mostraban coleoptilo y zonas meristemáticas en los extremos y embrión globular (Figuras 3A y 3B). También se observó un primordio foliar y proembriones, caracterizados por su estructura globular que muestran células meristemáticas y haces de tejido vascular (Figuras 3C y 3D). Otra característica propia identificada es el cotiledón, el cual, según Cabral *et al.* (2011) envuelve al eje embrionario donde el coleoptilo es típicamente tubular, y se encuentra localizado cerca de la vaina del meristemo del vástago (Figura 3E).

**Regeneración de planta.** Los callos inducidos bajo estrés osmótico fueron los únicos que mostraron respuesta de regeneración. Sorpresivamente, los callos suaves (organogénicos) y secos en apariencia mostraron una frecuencia de regeneración de 20 % en medio MR-2 (Figura 2A). Sin embargo, las plántulas anormales (brotes adventicios) obtenidas a partir de estos callos mostraron necrosis y murieron a los pocos días. Un alto porcentaje de regeneración en CE se observó en medios suplementados con cinetina/ANA/AG<sub>3</sub>, con el mayor valor (95.8 %) en MR-2, mientras que el menor porcentaje de regeneración (66.7 %) se observó en el medio suplementado con thidiazurón (TDZ, MR-4; Cuadro 4).



**Figura 1.** Tipos de callo obtenidos de un ecotipo apomítico de *B. curtipendula* *in vitro*, en diferentes medios de inducción. A) Suave acuoso, B) Friable, C) Envuelto en mucilago, D) Semicompacto, E) Compacto duro, F) Embriogénico, con pigmento clorofílico. Escala: Barra 1 mm.

Los embriones somáticos colocados en medio de maduración respondieron con regeneración temprana de plantas la cual continuó cuando fueron transferidos a medio de regeneración (Figuras 2C y 2D). El papel del sorbitol ha sido relacionado con el balance entre hormonas vegetales endógenas y exógenas, lo que ha permitido incrementar la regeneración (Huang *et al.*, 2012). Según Cabral *et al.* (2011), los callos embriogénicos obtenidos a partir de cariósides maduros normalmente no se producen. Por tanto, se infiere que la inducción de embriogénesis somática aquí lograda en *B. curtipendula* se debió a la inducción de estrés osmótico (o sinergia hormonal) para propiciar la formación de masas proembriogénicas.

En callos inducidos a partir de los medios MI-7 y MI-8 se desarrollaron escutelos fusionados, en los cuales no se observó regeneración de plantas cuando fueron colocados en los diferentes medios de regeneración. En *B. brizantha* Cabral *et al.* (2011) sí lograron la regeneración con estos medios, que atribuyeron a la acumulación de 2,4-D en la célula. Los callos embriogénicos colocados en diferentes medios de regeneración no mostraron diferencias en conversión a planta (Cuadro 5).

La mayor regeneración (13.9 %) fue observada en el medio MR-2 que contenía cinetina (1 mg L<sup>-1</sup>), ANA (0.2 mg L<sup>-1</sup>) y AG<sub>3</sub> (0.2 mg L<sup>-1</sup>). Los bajos porcentajes de conversión

**Cuadro 2. Medias y errores estándar (n = 4) de tipos y frecuencias de callos obtenidos en un ecotipo apomictico de *B. curtipendula* en diferentes medios de inducción.**

Medio	Morfogénesis de callos (%)					Frecuencia de inducción (%)
	Suave	Friable	Compacto y semicompacto	Envuelto en mucilago	Callos embriogénicos	
MI-1	69.8 ± 4.6	25.9 ± 5.2	0.0 ± 0.0	4.3 ± 2.8	0.0 ± 0.0	46.5 ± 5.5 bc
MI-2	22.1 ± 4.0	73.1 ± 5.3	4.9 ± 2.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	28.5 ± 2.5 de
MI-3	86.7 ± 5.2	9.4 ± 4.1	0.0 ± 0.0	3.8 ± 3.8	0.0 ± 0.0	34.7 ± 4.3 dc
MI-4	51.7 ± 5.5	17.5 ± 11.8	0.0 ± 0.0	30.8 ± 10.8	0.0 ± 0.0	8.7 ± 1.1 f
MI-5	25.3 ± 9.2	56.5 ± 10.8	0.0 ± 0.0	18.2 ± 7.2	0.0 ± 0.0	16.8 ± 5.0 ef
MI-6	16.3 ± 6.0	59.0 ± 14.7	0.0 ± 0.0	24.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0	10.4 ± 3.4 f
MI-7	35.6 ± 8.3	64.4 ± 8.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	20.3 ± 2.0 def
MI-8	41.3 ± 3.7	41.0 ± 5.0	5.9 ± 3.4	11.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0	16.4 ± 2.0 ef
MI-9	30.0 ± 4.9	64.7 ± 6.3	0.0 ± 0.0	5.3 ± 3.1	0.0 ± 0.0	18.4 ± 2.7 def
MI-10	34.1 ± 10	63.2 ± 9.3	0.0 ± 0.0	2.8 ± 2.8	0.0 ± 0.0	12.7 ± 1.1 ef
MI-11	0.0 ± 0.0	37.8 ± 5.5	0.0 ± 0.0	62.2 ± 5.5	0.0 ± 0.0	17.9 ± 3.2 def
MI-12	12.0 ± 2.7	80.0 ± 2.8	5.7 ± 2.1	2.4 ± 1.5	0.0 ± 0.0	66.3 ± 5.1 a
MI-13	66.7 ± 20	13.0 ± 5.7	18.5 ± 16.2	1.8 ± 1.8	0.0 ± 0.0	52.0 ± 1.6 ab
MI-14	4.5 ± 4.5	41.5 ± 9.7	43.1 ± 6.0	6.6 ± 2.3	4.3 ± 2.5	66.2 ± 4.3 a

Medias en una columna seguidas por diferente letra son diferentes significativamente (Tukey, 0.05).

**Cuadro 3. Estimación de factores mediante regresión logística para la variable inducción de callo.**

Componente	Estimador	Chi cuadrada de Wald	Pr > Chi cuadrada
Intercepto	- 0.9903	78.3940	< 0.0001**
2,4-D	0.0300	0.5023	0.4785
Cinetina	- 1.1945	32.9956	< 0.0001**
6-Bencilaminopurina	8.1922	144.4121	< 0.0001**
Sorbitol	- 0.5351	6.0966	0.0135*
2,4-D x 6-BAP	8.6823	186.8092	< 0.0001**
2,4-D x sorbitol	-1.9131	35.1351	< 0.0001**

\* Significativo con P < 0.05, \*\*Significativo con P < 0.01.

encontrados (11 a 14 %) muestran que solamente una mínima parte de embriones diferenciados llegan a ser plantas, tal y como ha ocurrido en otras plantas apomícticas. Una de las funciones del sorbitol es como fuente primaria de carbono y regulador osmótico para incrementar la regeneración en callos (Geng *et al.*, 2008); el ácido abscísico (ABA) también ha sido empleado para promover el desarrollo de embriones somáticos y mejorar la regeneración (Huang *et al.*, 2012), así como en inducir la maduración de embriones somáticos tardíos (Fernando y Gamage, 2000).

Los presentes resultados muestran la influencia positiva del estrés osmótico en la inducción de embriogénesis so-

mática de *B. curtipendula*. Las masas de callos proembriogénicas estuvieron bien diferenciadas cuando se colocaron en medio de regeneración. La relación CIN/ANA/AG<sub>3</sub> fue determinante en regeneración de callos embriogénicos, y se encontró mejor respuesta conforme se redujo la concentración de reguladores de crecimiento en los medios de regeneración. El efecto del thidiazurón observado en callos embriogénicos no se detectó en otros tipos de callos obtenidos. En todos los casos que se alcanzó la regeneración se obtuvieron plantas normales, por lo que esta investigación constituye el primer paso para el mejoramiento de la especie mediante cultivo de tejidos.

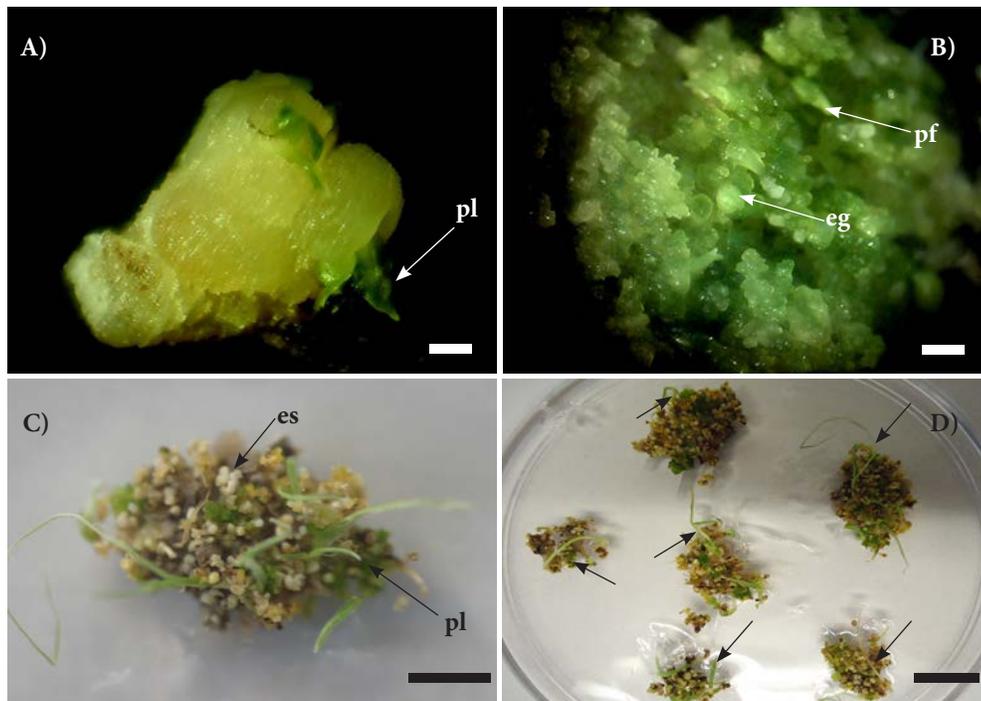


Figura 2. Embriogénesis somática en *Bouteloua curtipendula* a partir de explantes de cariósides maduras bajo estrés osmótico. A) Plántulas emergiendo de callo suave; B) Masa de callos proembriogénicos, mostrando embrión globular y primordio foliar; C) Embriones somáticos diferenciados, mostrando regeneración; D) Regeneración. *pl* plántula, *eg* embrión globular, *pf* primordio foliar, *es* embrión somático. Escalas: A, B: Barra 1mm; C: Barra 2mm; D: Barra 1cm.

## CONCLUSIONES

Callos inducidos bajo estrés osmótico o con balance hormonal inducido por la presencia de sorbitol estimularon la formación de callos organogénicos y embriogénicos en *B. curtipendula*. Solamente los callos embriogénicos formados en medios de cultivo con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + BAP + sorbitol, dieron origen a plantas regeneradas normales, mostrando diferentes porcentajes de regeneración en los medios evaluados. En esta investigación queda establecido el primer protocolo de regeneración mediante embriogénesis somática desarrollado en *Bouteloua curtipendula*.

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de becas de CONACyT. A las LPI11 y LPI16 del Colegio de Postgraduados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agresti A. (2002) Categorical Data Analysis. Wiley-Interscience. 2nd ed. University of Florida, Gainesville, FL. ISBN 0-471-36093-7.
- Aguado-Santacruz G. A., J. L. Cabrera-Ponce, V. Olalde-Portugal, M. R. Sánchez-González, J. Márquez-Guzmán and L. Herrera-Estrella (2001) Tissue Culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. Ex Steud. *In vitro Celular & Developmental Biology-Plant Sciences* 37:182-189.
- Aina O., K. Quesenberry and M. Gallo (2012) Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. *Crop Science* 52:1076-1083.
- Bernal-Flores A., A. R. Quero-Carrillo, P. Pérez-Rodríguez, Z. Y. Wang, H. A. Zavaleta-Mancera y M. E. Ortega-Cerrilla (2013) Callos Suaves Incrementan la Eficiencia de Regeneración *Bouteloua curtipendula*. IV Cong. Intnal. de Pastizales. Texcoco, Edo de México. pp:160-164.
- Cabral G. B., V. T. C. Carneiro, A. L. Lacerda, C. B. do Valle, A. P. Martinelli and D. M. A. Dusi (2011) Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107:271-282.
- Carloni E., A. Ribotta, C. E. López, S. Griffa, M. Quiroga, E. Tommasino and K. Grunberg (2014) Somatic embryogenesis from *in vitro* anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117:311-322.
- Chen L., Ch. K. Auh, P. Dowling, J. Bell, D. Lehmann and Z. Y. Wang (2004) Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Functional Plant Biology* 31:235-245.
- Fehér A., T. P. Pasternak and D. Dudits (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201-228.
- Fernando S. C. and C. K. A. Gamage (2000) Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science* 151:193-198.
- Fridovich I. (1986) Biological effects of superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247:1-11.
- Geng P. P., H. G. La, H. Q. Wang and E. J. C. Stevens (2008) Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92:303-313.
- Gould F. W. (1979) The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Annals of the Missouri*

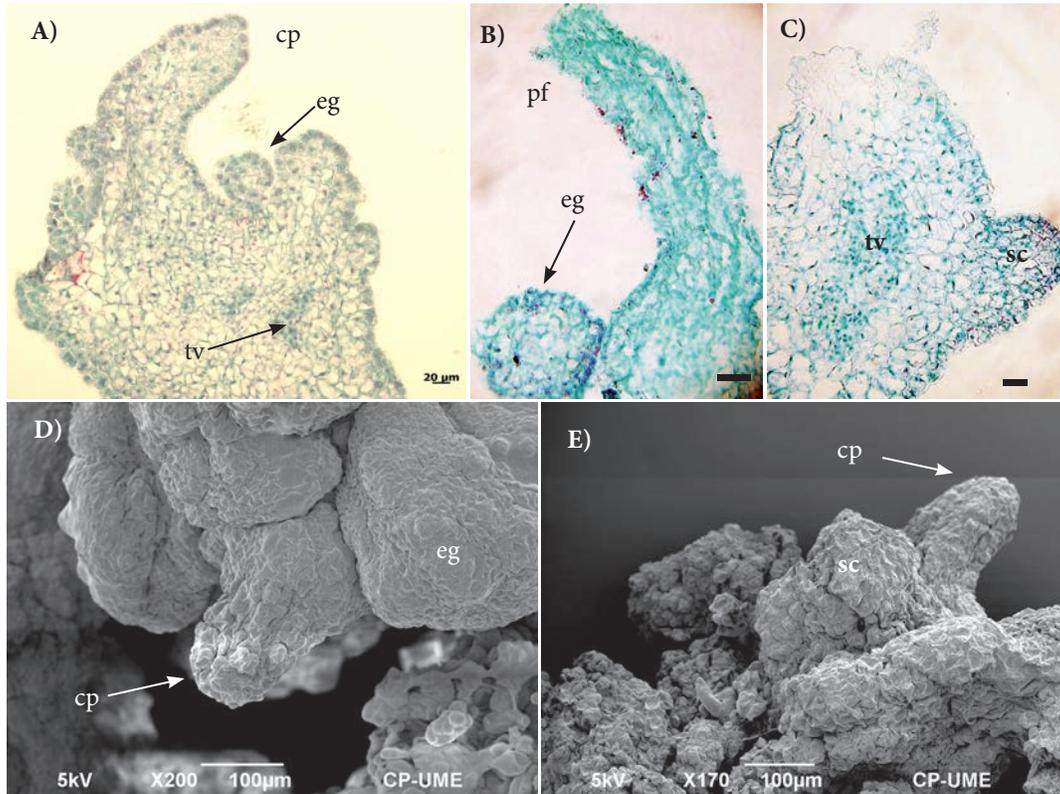


Figura 3. Embriogénesis somática en *Bouteloua curtipendula*. Cortes histológicos; A) y B) Embrión somático fase globular y con primordio foliar desarrollado después de 5 d de haber sido transferido a medio de regeneración. Barra: 20 μm. C) Embrión en fase escutelar temprana, que muestra tejido vascular poco diferenciado. Barra: 20 μm. Microscopia electrónica de barrido. D) Masa proembriogénica (MPE) en fase globular y escutelar, que muestra desarrollo de embriones en la periferia de la MPE. E) Embriones somáticos en fase escutelar y coleoptilar tardía, observadas 10 d después de haber sido transferidos al medio MR-2. *cp* coleóptilo, *eg* embrión globular, *pf* primordio foliar, *sc* escutelo, *tv* tejido vascular.

Cuadro 4. Promedios y errores estándar (n = 4) de la regeneración de plántulas a partir de callos inducidos bajo estrés osmótico en *Bouteloua curtipendula* apomítica.

Medio	Frecuencia de regeneración de plántulas (%)	
	Callos suaves	Callos embriogénicos
MR-1	8.3 ± 4.8 b	87.5 ± 4.2 <sup>a</sup>
MR-2	20.8 ± 8.0 a	95.8 ± 4.2 <sup>a</sup>
MR-3	8.1 ± 4.8 b	91.7 ± 4.8 <sup>a</sup>
MR-4	0.0 ± 0.0	66.7 ± 6.8 <sup>b</sup>

Medias dentro de columna seguidas por diferente literal, son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Cuadro 5. Medias y errores estándar (n = 4) de regeneración de plántula y eficiencia de conversión en callos embriogénicos de *Bouteloua curtipendula*, para diferentes medios de regeneración.**

Medio	Núm. de embriones <sup>†</sup> (1 g callo)	Núm. de plantas (1 g callo)	Eficiencia de conversión (%) (1 g callo)
MR-1	35.5 ± 5.8	4.3 ± 0.6	12.1 ± 2.3 a
MR-2	38.0 ± 3.2	5.3 ± 0.9	13.9 ± 2.7 a
MR-3	27.0 ± 2.0	3.0 ± 0.4	11.1 ± 1.6 ab
MR-4	35.0 ± 1.0	4.0 ± 0.4	11.4 ± 1.0 a

Medias en una columna con diferente literal son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). <sup>†</sup>Contados al microscopio estereoscópico, a los 30 d de haber colocado los callos en medio de inducción.

- Botanical Garden* 66:348-416.
- Hu X. R., Yang A. F., Zhang K. W., Wang J. and Zhang J. R. (2006) Optimization of in vitro multiple shoot clump induction and plantlet regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:89-98.
- Huang W. L., Ch. H. Lee and Y. R. Chen (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:257-263.
- Immonen S. and Anttila H. (1999) Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57:121-127.
- Jensen W. A. (1962) Botanical Histochemistry. Principles and Practice. Freeman W. H. & Co., San Francisco, CA. pp:71-91.
- Johansen D. A. (1940) Plant Microtechnique. McGraw-Hill, New York. pp:1-523.
- Lichtenthaler H. K. (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851:187-198.
- Mancini M., N. Voitovich, H. R. Permingeat, M. Podio, L. A. Siena, J. P. A. Ortiz, S. C. Pessino and S. A. Felitti (2014) Development of a modified transformation platform for apomixis candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant Science* 50:412-424.
- McCue K. F. and D. Hanson (1990) Drought and salt tolerance: Towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* 8:358-362.
- Mirlohi A. F., L. F. Thompson, R. H. Dilday, F. H. Huang and J. M. Al-Khayri (1989) In vitro culture of several rice cultivars. *Proceedings of the Arkansas Academy of Science* 43:55-56.
- Morales N. C. R., A. R. Quero, A. Hernández, J. Pérez y S. S. González (2006) Evaluación de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., mediante marcadores de AFLP. *Agrociencia* 40:711-720.
- Murashige T. and F. Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Narusaka Y., K. Nakashima, Z. K. Shinwari, Y. Sakuma, T. Furihata, H. Abe, M. Narusaka, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant Journal* 34:137-148.
- Osuna P. and J. R. Barrow (2004) Regeneration of black grama (*Bouteloua eriopoda* Torr. Torr) plants via somatic embryogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant Sciences* 40:299-302.
- Park S. Y., H. M. Cho, H. K. Moon, Y. W. Kim and K. Y. Paek (2011) Genotypic variation and aging effects on the embryogenic capacity of *Kalopanax septemlobus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:265-270.
- Quero C. A. R. (2001) Recursos genéticos forrajeros para zonas áridas. El complejo agámico de zacate Banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. In: J. Pérez P., A. Hernández y A. Gómez (eds.). Los Forrajes en México: Presente y Futuro. XXXII Aniversario Especialidad de Ganadería. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. pp:25-56.
- Quero C. A. R., Enriquez Q. J. F., Morales N. C. R. y Miranda J. L. (2010) Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1:25-42.
- Rakshit S., Z. Rashid, J. C. Sekhar, T. Fatma and S. Dass (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100:31-37.
- Rencher A. C. and G. C. Schaalje (2008) Additional Models: In: Linear Models in Statistics. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken New Jersey. pp:507-517.
- Seo M. S., M. Takahara, M. Ebina and T. Takamizo (2008) Evaluation of tissue culture response from mature seed of *Panicum* spp. *Japanese Journal of Grassland Science* 54:125-130.
- SAS, Statistical Analysis System (2004) SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1. User's Guide Cary, NC: SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA.
- Stephens L. C., Fei S. Z., Xiong Y. and Hodges C. F. (2006) Plants regenerated from embryo cultures of an apomictic clone of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. "Baron") are not apomictic in origin. *Euphytica* 147:383-388.
- Ul-Hassan M., Z. Ahmed, M. Munir, S. I. Malik and K. Shahzad (2009) Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology* 8:6529-6535.
- Van Dick P. and J. Van Damme (2000) Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science* 5:81-84.
- Wang X., Y. Hoshino and T. Yamada (2010) Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Japanese Journal of Grassland Science* 56:198-204.
- Wei Z. M., M. Kyo and H. Harada (1986) Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv 'Sabarlis'. *Theoretical and Applied Genetics* 72:252-255.
- Xiong L., K. S. Schumaker and J. K. Zhu (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell* 14:S165-S183.
- Zappacosta D., A. Ochogavía, J. M. Rodrigo, J. R. Romero, M. S. Meier, I. Garbus, S. C. Pessino and V. C. Echineque (2014) Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific Reports* 4:1-7.
- Zhang B., K. Liu, Y. Zhang, Y. Wang, J. Wang and H. Liao (2013) Disruption of AtWINK8 enhances tolerance of Arabidopsis to salt and osmotic stresses via modulating proline content and activities of catalase and peroxidase. *International Journal of Molecular Sciences* 14:7032-7047.