

## Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina

L. MARINUCCI <sup>(1,2)</sup>, M. RUSCITTI <sup>(2)</sup> & W. ABEDINI <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC PBA).

<sup>(2)</sup> Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. República Argentina. C.C.31.(1900) La Plata. Bs. As. Argentina.  
E-mail: ceprove@agro.unlp.edu.ar

MARINUCCI, L., M. RUSCITTI & W. ABEDINI. 2004. Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Rev. Fac. Agron.* 105 (2): 27-36.

El objetivo de este trabajo fue inducir la morfogénesis *in vitro* en cotiledones inmaduros de leguminosas forestales nativas de la República Argentina: *Erythrina crista-galli* L. (seibo), *Acacia caven* (Mol.) Mol. (espinillo), *Parkinsonia aculeata* L. (cina-cina), *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. (espina de corona) y *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (acacia mansa). Las legumbres verdes fueron recolectadas de árboles que crecen naturalmente en los alrededores de la ciudad de La Plata (34° 55' S; 57° 57' W; 15 m snm), Provincia de Buenos Aires. Los frutos fueron desinfectados en superficie, se extrajeron las semillas inmaduras y se separaron los cotiledones del eje embrionario. Los cotiledones fueron cultivados en el medio basal Murashige-Skoog (MS), con sus macro y micronutrientes a la mitad de su concentración, suplementado con 3% de sacarosa, 0,65% de agar, 0,165 g/l de NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>, 1 ppm de 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxi acético) y 0,1 ppm de Kin (cinetina). Los cultivos fueron incubados a 25 +/- 2 °C y 16 horas de luz con una irradiancia de 60 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Se obtuvieron embriones somáticos en *Acacia caven*, regeneración de brotes y raíces adventicias en *Parkinsonia aculeata*, callos y raíces en *Gleditsia amorphoides* y callos en *Erythrina crista-galli* y *Sesbania punicea*. Los resultados sugieren que algunas leguminosas nativas de la República Argentina pueden ser propagadas mediante técnicas de cultivo de tejidos.

**Palabras claves:** *Erythrina crista-galli*, *Acacia caven*, *Parkinsonia aculeata*, *Gleditsia amorphoides*, *Sesbania punicea*.

MARINUCCI, L., M. RUSCITTI & W. ABEDINI. 2004. *In vitro* Morphogenesis of Native Trees Leguminous of Argentina. *Rev. Fac. Agron.* 105 (2): 27-36.

The aim of this work was to induce the *in vitro* morphogenesis from immature cotyledons of leguminous native trees from Argentina: *Erythrina crista-galli* L. (seibo), *Acacia caven* (Mol.) Mol. (espinillo), *Parkinsonia aculeata* L. (cina-cina), *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. (espina de corona) and *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (acacia mansa). Inmature fruit were recollected from trees growing in La Plata (34° 55'S; 57° 57'W; 15 m asl), Buenos Aires. Fruit were surface sterilized and inmature seeds were removed, cotyledons were separated from the embriogenic axis. Cotyledons were established in Murashige-Skoog (MS) basal medium at half strength macro and micronutrients, supplemented with 3% sucrose, 0.65% agar, 0.165 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and growth regulators (1 ppm 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) and 0.1 ppm Kin (Kinetin)). The cultures were incubated at 25 +/- 2°C and 16 hours of light in irradiance of 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Somatic embriogenesis was observed in *Acacia caven*, adventitious shoot and roots regeneration in *Parkinsonia aculeata*, differentiating callus and roots were induced in *Gleditsia amorphoides*, while in *Erythrina crista-galli* and *Sesbania punicea* only calluses were formed. Results suggest that some leguminous native from Argentine could be propagated by tissue culture techniques.

**Key words:** *Erythrina crista-galli*, *Acacia caven*, *Parkinsonia aculeata*, *Gleditsia amorphoides*, *Sesbania punicea*, histology.

Recibido: 13/09/01. Aceptado: 12/12/03.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación de material vegetal (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999). Esta técnica permite la propagación de árboles y proporciona una ventaja económica importante a la industria forestal (Attree & Fowke, 1993; Gupta *et al.*, 1993). Además, permite reducir los largos períodos de maduración, la baja viabilidad de las semillas y la dificultad que presentan algunos individuos de propagarse por métodos tradicionales (Trigiano *et al.*, 1992).

La morfogénesis, se define como el origen y los cambios en la forma específica (estructura y organización) durante el desarrollo de un organismo, esto puede ocurrir en la organogénesis o en la embriogénesis somática y dependen tanto de la naturaleza del explanto como del genotipo (Endress, 1994). La organogénesis consiste en la formación de *novo* de órganos (raíces y/o brotes adventicios) en los explantos cultivados *in vitro* (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999). La embriogénesis somática, en tanto, es la capacidad de ciertas células vegetales para formar embriones, estos embriones somáticos germinan y dan origen a individuos completos con el fenotipo de la planta donante de la célula inicial (Pérez Molphe Balch, *et al.*, 1999).

Los tejidos juveniles presentan frecuentemente una mayor aptitud para la organogénesis adventicia que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes. Esta aptitud está ampliamente aprovechada en la multiplicación vegetativa *in vitro*, sobre todo en los casos de especies difíciles de propagar, especialmente, las leñosas. En muchas especies los cotiledones expandidos de plántulas producen más brotes adventicios que todo el embrión, hipocótilo, o cualquier otro tejido de la plántula, convirtiéndolos en el mejor explanto (George, 1993). La organogénesis directa quedó demostrada por Gharyal & Maheswari (1981) en *Albizzia lebeck*; Kapoor &

Gupta (1986) en *Sesbania bispinosa*; Tomar & Gupta (1988) en *Albizzia sp.*; Detrez *et al.*, (1994) en *Sesbania grandiflora* y Jaiwal & Gulati (1991) en *Tamarindus indica*. En *Acacia koa* se obtuvieron brotes y raíces, a partir de callo (Skoleman & Mapes, 1976); Mukhopadhyay & Mohan Ram (1981) y Datta *et al.*, (1983) en *Dalbergia sisoo*; Khattar & Mohan Ram (1982, 1983) en *Sesbania sesban* y *Sesbania grandiflora*; Shanker & Mohan Ram (1990) en *Sesbania grandiflora*; Upadhyay & Chandra (1983) y Lakshman Rao & De (1987) en *Albizzia lebeck*; Dhawan & Bhojwani (1985) en *Leucaena leucocephala*; Lakshmi Sita *et al.*, (1986, 1992) y Ravishnkar Rai & Jagadishchandra (1988) en *Dalbergia latifolia*; Vlachova *et al.*, (1987) en *Sesbania rostrata*; Sarita *et al.*, (1988) en *Pterocarpus santalinus*; Mittal *et al.*, (1989) en *Acacia auriculiformis*; Sinha & Mallick (1991) en *Sesbania bispinosa*; Bansal & Pandey (1993) en *Sesbania aculeata*; Huang *et al.*, (1994) en *Acacia mearnsii* y Berger & Schaffner (1995) en *Swartzia madagascariensis*.

A partir de explantos juveniles se obtuvieron plantas completas de *Acacia caven*, *Parkinsonia aculeata* y *Erhrythrina crista-galli* (Abdini *et al.*, 2000).

La embriogénesis somática en especies de leguminosas leñosas está restringida al uso de explantos de semillas inmaduras o partes de plántulas. El período óptimo para la iniciación del cultivo *in vitro* está definido por la cantidad de días de la post-antesis (Arrillaga *et al.*, 1994; Das *et al.*, 1995; Merkle & Wiecko, 1989; Rao & Lakshmi Sita, 1996; Trigiano *et al.*, 1988, 1989; Weaver & Trigiano, 1991), por la morfología del desarrollo del embrión cigótico (Arrillaga *et al.*, 1994 y Trigiano *et al.*, 1995, 1988) y por el peso fresco del embrión cigótico (Distabanjong & Geneve 1997; Geneve & Kester 1990 y Trigiano *et al.*, 1996). El período de post-antesis es el momento más adecuado para la formación de embriones somáticos, aunque el proceso está muy influenciado por un gran número de factores,

tales como la localización geográfica y la calidad de sitio. Se han obtenido embriones somáticos en *Albizia lebbek* (Gharyal & Maheswari, 1981), *Albizia richardiana* (Tomar & Gupta, 1988b), *Cercis canadiensis* y *Cornus florida* (Trigiano *et al.*, 1988, 1989), *Robinia pseudoacacia* (Merkle & Wiecko, 1989), *Cladrastis lutea* (Weaver & Trigiano, 1991), *Hardwickia binata* (Das *et al.*, 1995) y *Dalbergia latifolia* (Rao & Lakshmi Sita, 1996).

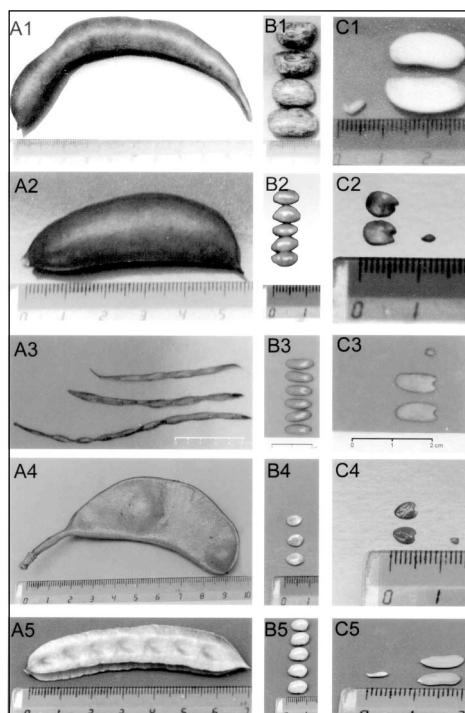
El área de distribución en la provincia de Buenos Aires de las especies bajo estudio *Acacia caven* (Mol.) Mol., *Erythrina crista-galli* (L.), *Parkinsonia aculeata* (L.), *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. y *Gleditsia amorphoides* (Gris.) Taubert, ha sufrido diversas modificaciones como reemplazo de comunidades naturales por agroecosistemas, modificaciones del suelo, incorporación de agroquímicos, cambios del balance hídrico regional e introducción masiva de especies exóticas, esto puede conducir a la pérdida irreversible de estas especies, incluso antes de que se hayan realizado estudios sobre su variación y características. Frente a esta problemática, es necesario ampliar los conocimientos de cada especie en particular, contribuyendo de esta manera con la conservación de los recursos fitogenéticos nativos.

El objetivo de este trabajo fue inducir la morfogénesis *in vitro* en cotiledones inmaduros de *Acacia caven*, *Erythrina crista-galli*, *Parkinsonia aculeata*, *Sesbania punicea*. y *Gleditsia amorphoides*, especies nativas de la provincia de Buenos Aires, para determinar si existen diferencias en el potencial morfogénico de cada especie, frente a las mismas condiciones de cultivo *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Tipo de explanto

Se utilizaron como explanto los cotiledones de semillas inmaduras obtenidas de legumbres verdes (90 días posteriores a la floración) de *Erythrina crista-galli*, *Acacia caven*,



**Foto 1.** Material vegetal utilizado en los tratamientos de morfogénesis *in vitro*. A- legumbre inmadura, B- semillas inmaduras C- cotiledones y eje embrionario. Especies forestales estudiadas: 1. *Erythrina crista-galli*. 2. *Acacia caven*. 3. *Parkinsonia aculeata*. 4. *Gleditsia amorphoides*. 5. *Sesbania punicea*.

*Plant material used in test of in vitro morphogenic. A- immature legume, B- immature seeds C- cotyledons and embryonic axis. Forestry species studied: 1. Erythrina crista-galli. 2. Acacia caven. 3. Parkinsonia aculeata. 4. Gleditsia amorphoides. 5. Sesbania punicea.*

*Parkinsonia aculeata*, *Gleditsia amorphoides* y *Sesbania punicea*, recolectadas durante el verano de 1999 de árboles que crecen en los alrededores de la ciudad de La Plata (34° 55' S; 57° 57' W; 15 msnm), Provincia de Buenos Aires, Argentina.

### 2. Elección, acondicionamiento y desinfección de los explantos

Para su desinfección, las legumbres verdes fueron tratadas en superficie con hipoclo-

rito de sodio comercial (55 g de Cl activo por litro) al 50% de su concentración, durante 1h y luego, se lavaron tres veces con agua bidestilada estéril. Las legumbres desinfectadas se cortaron con escalpelo a lo largo de la sutura carpelar para extraer las semillas inmaduras. Las mismas fueron desprovistas del tegumento, separándose los cotiledones, que fueron utilizados como explanto, descartándose el eje embrionario (Fotografía 1).

### 3. Medios y condiciones de cultivo

**3.1 Establecimiento de los cultivos.** Se utilizó el medio basal de MS (Murashige & Skoog, 1962), con los macro y micronutrientes a la mitad de su concentración y suplementado con 3% de sacarosa, 0,65% de agar, 1 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y 0,1 ppm de cinetina. Además, se agregó 0,165 g/l de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , al medio basal de MS, aumentando así, en un 10% el contenido original de nitrógeno. El pH se ajustó a 6 con hidróxido de sodio 1N y ácido clorhídrico 1N, y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a  $1,05\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$  a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 min. Las condiciones de cultivo fueron  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y 16 horas de luz, con una irradiancia de  $60\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los envases utilizados fueron recipientes de vidrio de  $45\text{mm} \times 95\text{mm}$  con 37 ml de medio de cultivo. El tamaño de muestra elegido fue de 60 cotiledones (2 por recipiente) por especie, y los explantos fueron colocados con la cara abaxial en contacto con el medio de cultivo.

**3.2. Multiplicación.** A los 45 días de iniciado el cultivo, los explantos se subcultivaron al medio basal de MS (1962) sin reguladores de crecimiento (PGR) y en las mismas condiciones ambientales de la etapa anterior.

**3.3 Germinación.** Los embriones somáticos obtenidos fueron aislados y sembrados en un medio basal de MS (1962), suplementado con 3% de sacarosa, 0,65% de agar y 0,5 ppm de  $\text{AG}_3$  (ácido giberélico), en las mismas condiciones ambientales de la primera etapa.

### 4. Aspectos histológicos de la morfogénesis

Se aplicaron las técnicas histológicas, para corte en fresco y cortes semifinos mencionadas por D'Ambrogio de Argueso (1986) y Johansen (1940). Con una cuchilla o navaja de afeitar se realizaron cortes longitudinales y transversales a mano alzada, del material fresco de explanto original, callo, primordio radicular, brote y embrión.

Para analizar los procesos morfofisiológicos y caracterizar citológicamente los cambios producidos en el material, los cortes fueron depositados en portaobjetos y observados en lupa binocular y en microscopio óptico. Se utilizaron diversas técnicas para la preparación de los cortes (tinción, montaje y fijación). La tinción se realizó con safranina al 1%, el montaje con agua-glicerina y se fijaron en FAA (formol-alcohol etílico-ácido acético y agua) (D'Ambrogio de Argueso, 1986).

### 5. Toma de datos

Cada 15 días, se determinó el porcentaje de supervivencia de los explantos y las diferentes respuestas morfogénicas (formación de callo, raíces, brotes y embriones somáticos). A los 30 días de cultivo se evaluó el peso fresco de los callos, el porcentaje de explantos con raíz, con brotes adventicios y la formación de embriones somáticos por gramo de callo.

## RESULTADOS

El establecimiento de los explantos se logró satisfactoriamente en el medio de cultivo utilizado, presentando un 3% de contaminación con bacterias, que no alteró los resultados ya que este material fue descartado. Se observó la formación de callo, de tamaño y aspecto variable en las diferentes especies estudiadas (Tabla 1).

En este trabajo se logró inducir la morfogénesis en cinco especies forestales nativas

**Tabla 1.** Capacidad morfogénica de leguminosas forestales nativas de Argentina luego de 60 días de cultivo *in vitro*.Morphogenic capacity of Argentinean natives trees leguminous after 60 days of culture *in vitro*.

ESPECIE	Respuestas morfogénicas (%)							
	(%) deSuper- vivencia de los explantos	Callo	Brotes (directa)	Raíces (directa)	Embriones somáticos (directa)	Brotes (indirecta)	Raíces (indirecta)	Embriones somáticos (indirecta)
<i>Erythrina crista-galli</i>	76,66	76,66	—	—	—	—	—	—
<i>Acacia caven</i>	90,00	90,00	—	—	33,33	—	—	90
<i>Parkinsonia aculeata</i>	73,33	73,33	16,66	—	—	33,33	60	—
<i>Gleditsia amorphoides</i>	36,66	33,33	—	—	—	—	6,66	—
<i>Sesbania punicea</i>	80,00	80,00	—	—	—	—	—	—

de la provincia de Buenos Aires, pertenecientes a la familia Leguminosae, y se observaron marcadas diferencias en el potencial morfogénico de cada especie.

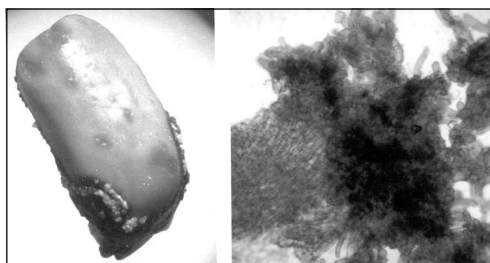
De las especies estudiadas, sólo se obtuvieron embriones somáticos en *Acacia caven*. En *Parkinsonia aculeata* se observó la formación de brotes y raíces y en *Erythrina crista-galli*, *Sesbania punicea* y *Gleditsia amorphoides* hubo escasa diferenciación de órganos.

### 1- *Erythrina crista-galli*

A los 15 días de iniciado el cultivo, se observó la formación de callo de aspecto compacto y de color marrón oscuro ubicado en los bordes del cotiledón. Se observaron células alargadas y desorganizadas, sin diferenciación alguna (Fotografía 2). A los 30 días de incubación, los explantos se oxidaron, posteriormente se necrosaron y murieron.

### 2- *Acacia caven*

A los 15 días de cultivo, se observó la formación de callo color verde y aspecto friable en los bordes del cotiledón y a los 30 días este callo proliferó en la totalidad de la superficie del explanto. El análisis histológico reveló la existencia de masas de células proembriónicas y embriones somáticos, en diferentes estados: globular, corazón y torpedo. Además, se observaron embriones somáticos originados en forma directa, sobre la cara abaxial del cotiledón (Fotografía 3). A los 60 días de cultivo se observó la formación de 57 embriones somáticos en estado globular por gramo de callo. Estos fueron aislados y cultivados en un medio adecuado para su germinación, lográn-



**Fotografía 2.** Capacidad morfogénica de *Erythrina crista-galli*. A. Callo originado sobre el cotiledón. B. Células del callo observadas al microscopio óptico 40X.

Morphogenic capacity of *Erythrina crista-galli*. A. Calli on cotyledon. B. Calli cells observed with optic microscope 40X.

**Tabla 2.** Diferentes respuestas del cultivo *in vitro* de cotiledones de *Parkinsonia aculeata*.

Different responses of *Parkinsonia aculeata* cotyledons culture *in vitro*.

	15 días de cultivo	30 días de cultivo	45 días de cultivo	60 días de cultivo
Long. Prom. de cotiledones (cm)	1,20	1,70	2,00	2,00
Explantos con raíces (%)	0,00	30,00	48,30	60,00
Promedio de n° de raíces por explanto	0,00	2,16	4,28	6,25
Long. prom. de raíces (cm)	0,00	0,80	1,70	2,50
Explantos con brote (%)	6,66	35,00	43,30	50,00
Promedio de n° de brotes por explanto	0,73	1,13	2,07	2,88
Long. prom. de brotes (cm)	0,2	1,10	1,80	2,00

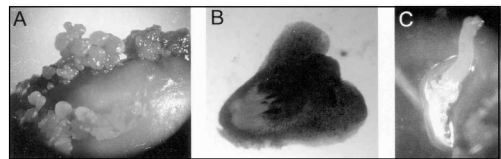
dose a las 48 hs el 10 % de germinación (aparición de la radícula).

### 3- *Parkinsonia aculeata*

A los 15 días de cultivo, los cotiledones comenzaron a elongarse y se curvaron como consecuencia de la formación de callo en los bordes. Al mismo tiempo, se originaron brotes adventicios, en forma directa sobre la cara abaxial del explanto. Transcurridos 30 días, el callo cubrió toda la superficie del cotiledón y se observó la formación de brotes adventicios y raíces, en forma indirecta (Tabla 2). Los callos, de aspecto compacto y color marrón, estaban constituidos por capas superficiales de células poco diferenciadas, en el centro de los mismos se observó la presencia de traqueidas y haces vasculares agrupados en zonas pro-meristemáticas, que dieron origen a brotes y raíces. (Fotografía 4).

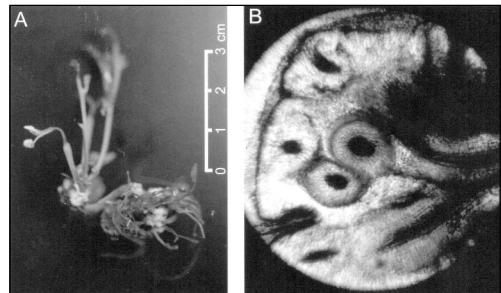
### 4- *Gleditsia amorphoides*

Después de 15 días de cultivo se observó la formación de callo en los bordes del cotiledón, estos callos estaban constituidos por células alargadas y desorganizadas, que luego diferenciaron raíces en el 19 % de los explantos. A los 60 días de cultivo, estos callos se oxidaron, necrosaron y murieron (Fotografía 5).



**Fotografía 3.** Capacidad morfogénica de *Acacia caven*. A. Callo embriogénico originado sobre el cotiledón donde se observan los embriones somáticos. B. Sección longitudinal de un embrión somático visto al microscopio óptico 40X. C. Embrión somático germinado.

*Morphogenic capacity of Acacia caven.* A. Embryogenic calli over a cotyledon and somatic embryo. B. Longitudinal section of a somatic embryo observed with optic microscope 40X. C. Germinated somatic embryo.



**Fotografía 4.** Capacidad morfogénica de *Parkinsonia aculeata*. A. Proliferación de brotes adventicios y formación de raíces a partir de callo. B. Zonas meristemáticas en callo 100X.

*Morphogenic capacity of Parkinsonia aculeata.* A. Proliferation of adventitious buds and roots formation make over calli. B. Meristematic zone in calli 100X.

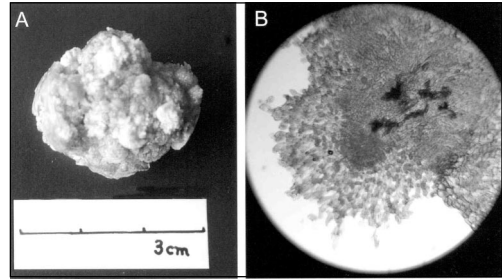
### 5- *Sesbania punicea*

A los 15 días de cultivo, los cotiledones comenzaron a desdiferenciarse, originando un callo de apariencia muy heterogénea con zonas de color marrón y friable, otras de color verde y compacto y una tercera zona de color blanco y aspecto níveo. Luego de 30 días de cultivo, estos callos cubrían toda la superficie del explanto, siendo su peso promedio de 0,943 g. A los 90 días el peso promedio de los callos fue de 1,128 g. Si bien se pudo observar un crecimiento en el tamaño de los callos, no se observó la formación de órganos a partir de los mismos. Al microscopio, los callos de color marrón y blanco están constituidos por células alargadas y desorganizadas. Los callos verdes presentaron escasa diferenciación celular, en el centro se observan grupos de traqueidas alargadas y hacia la superficie hay células de menor tamaño, isodiamétricas y con alto contenido de almidón (Fotografía 6).

## DISCUSIÓN

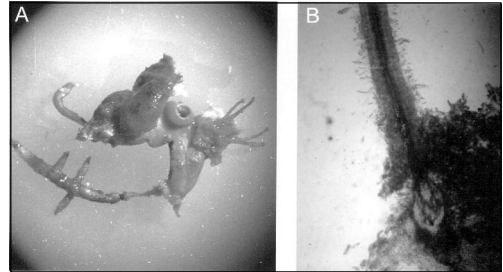
Según los resultados obtenidos en este trabajo, *Parkinsonia aculeata* presenta la capacidad de formar órganos en forma directa a partir de cotiledones inmaduros, coincidiendo con lo descrito por Kapoor & Gupta (1986) en *Sesbania bispinosa* y Detrez *et al.* (1994) en *Sesbania grandiflora*; y en forma indirecta, según lo señalado por Skoleman & Mapes (1976) en *Acacia koa* y Khattar & Mohan Ram (1982 y 1983) en *Sesbania sesban* y *Sesbania grandiflora*. A diferencia de lo citado por estos autores, no se logró la organogénesis directa ni indirecta en *Sesbania punicea*, utilizando el mismo explanto.

En *Acacia caven* los embriones somáticos se formaron a partir de los cotiledones inmaduros en forma directa e indirecta, observándose todos los estados característicos como globular, corazón y torpedo. Gharyal & Maheswari (1981) lograron los mismos resul-



**Fotografía 5.** Capacidad morfogénica de *Gleditsia amorphoides*. A. Raíces originadas a partir de callo. B. Detalle de la raíz al microscopio óptico 40X.

*Morphogenic capacity of Gleditsia amorphoides.* A. Roots formation from calli. B. Roots detail observed with optic microscope 40X.



**Fotografía 6.** Capacidad morfogénica de *Sesbania punicea*. A. Callo originado sobre el cotiledón. B. Células del callo observadas al microscopio óptico 40X.

*Morphogenic capacity of Sesbania punicea.* A. Calli on cotyledon. B. Calli cells observed with optic microscope 40X.

tados en *Albizzia lebbbeck* a partir de hipocótilo, mientras que otros explantos procedentes de plántulas, como cotiledones no mostraron ninguna diferenciación.

En *Albizzia richardiana*, Tomar & Gupta (1988b) describen similares resultados a partir de segmentos de hipocótilo de plántulas de 12 días y sostienen que el tamaño del explanto es de gran importancia para la obtención de callos embriogénicos. Explantos mayores de 10 mm originaron yemas, mientras que ex-

plantos de 1 mm produjeron callo embriogénico en medio suplementado con citoquininas.

La formación de embriones somáticos depende de la edad del explanto. Trigiano *et al.* (1988) obtuvieron callos y raíces en explantos de 117 días de post antesis, mientras que con explantos de 96 a los 110 días de post antesis se obtuvieron embriones somáticos en *Cercis cannadensis*

Rao & Lakshmi Sita (1996) obtuvieron embriones somáticos en forma directa a partir de ejes embrionarios inmaduros en *Dalbergia latifolia*, en este trabajo se obtuvo el mismo resultado pero a partir de cotiledones inmaduros. En ambos casos se utilizó un medio de cultivo suplementado con 2,4-D y cinetina.

Una variedad de factores modifican las respuestas morfogénicas observadas en los explantos cultivados *in vitro*. Todos estos factores pueden resumirse en el término "control fisiológico", haciendo referencia a los factores físicos y químicos que se encuentran dentro de las células o en el ambiente que rodea a las células, modificando las respuestas morfogénicas, dentro de los límites genéticos o restricciones epigenéticas (Halperin, 1986).

En general, la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende, en mayor medida, de la interacción entre el nivel hormonal endógeno y el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo. De acuerdo a esto, cada explanto o un mismo explanto pero de diferente especie, pueden responder de manera distinta a una misma concentración de reguladores de crecimiento, a causa de diferencias en el contenido hormonal endógeno (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

En este trabajo, utilizando cotiledones de semillas inmaduras de cinco leguminosas forestales como explantos, se observó la formación de callo en los bordes de los cotiledones, los que, con el transcurso del tiempo, cambiaron de aspecto, dando una respuesta diferencial de la capacidad morfogénica de las especies bajo estudio. Es así, que en *Parkinsonia*

*aculeata* se obtuvo la formación, a partir del callo originado *in vitro*, de brotes adventicios que posteriormente enraizaron. En la cara abaxial del cotiledón, estos brotes se formaron directamente.

En *Acacia caven* se observó la formación de embriones somáticos, en los callos originados *in vitro* y en forma directa, en la cara abaxial de los cotiledones.

De esta manera, queda demostrada la capacidad embriogénica de *Acacia caven* y la capacidad organogénica de *Parkinsonia aculeata*, mientras que las restantes especies, sólo formaron callo. Por lo tanto, sería oportuno profundizar los estudios de cada especie en particular, modificando distintas variables relacionadas con el medio de cultivo, especialmente los reguladores de crecimiento, ya que cada tejido tiene una determinada "sensibilidad" ante los reguladores de crecimiento, lo que los hace más o menos capaces de responder ante ellos (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

## AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Mariana Nuñez por su participación en los estudios histológicos y al señor Juan Sebastián Marinucci por la colaboración prestada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, W., P. Boeri, L. Marinucci, M. Ruscitti & L. Scelzo.** 2000. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales Vol. 9: 31-43.
- Arrillaga, I., S. A. Tobolski & S. A. Merkle.** 1994. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust. Plant Cell Report 13: 171-175.
- Attree, S. M. & L. C. Fowke.** 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Culture 35: 1-35.
- Bansal, Y. K. & P. Pandey.** 1993. Micropropagation of *Sesbania aculeata* (Pers) by adventi-



- tious organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 351-355.
- Berger, K. & W. Schaffner.** 1995. *In vitro* propagation of leguminous tree *Swartzia madagascariensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40: 289-291.
- Brown, D. C. W. & T. A. Thorpe.** 1986. Plant regeneration by organogenesis. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants* Vol. 3. Academic Press, The Netherlands.
- D'Ambrogio de Argueso, A.** 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Ed. Hemisferio Sur S.A. Bs. As. Pp.83.
- Das, A. B., G. R. Rout & P. Das.** 1995. *In vitro* somatic embryogenesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Report* 15: 147-149.
- Datta, S. K., K. Datta, & T. Pramanik.** 1983. *In vitro* clonal multiplication of mature trees of *Dalbergia sisoo* (Roxb.) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2: 15-20.
- Detrez, C., S. Ndiaye & B. Dreyfus.** 1994. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. *Plant Cell Report* 14: 87-93.
- Dhawan, V. & S. S. Bhojwani.** 1985. *In vitro* propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam de wit). *Plant Cell Report* 4: 315-318.
- Distabanjong, K. & R. L. Geneve.** 1997. Multiple shoot formation from normal and malformed somatic embryo explants of eastern redbud (*Cercis canadensis* L.). *Plant Cell Report* 16:334-338.
- Endress, R.** 1994. Plant Regeneration: Morphogenesis, chapter 5. In: *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 353.
- Geneve, R. L. & S. T. Kester.** 1990. The initiation of somatic embryos and adventitious roots from developing zygotic embryos explants of *Cercis canadensis* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22: 71-76.
- George, E. F.** 1993. Plant propagation by Tissue Culture. The Technology. Part 1. Exegetics Ltd. Edington. 574 pp.
- Gharyal, P. K. & S. C. Maheswari.** 1981. *In vitro* differentiation of somatic embryoids in a leguminous tree-*Albizia lebeck*. *Nature wissenschaften* 68: 379-380.
- Gupta, P. K., G. Pullman, R. Timmins, M. Kreitingner, W. C. Carlson, J. Grob & E. Welty.** 1993. Forestry in the 21 st century: the biotechnology of somatic embryogenesis. *BioTechnology* 11: 454-459.
- Halperin, W.** 1986. Attainment and retention of morphogenic capacity *in vitro*. Chapter 1. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants* Vol. 3. Academic Press, The Netherlands.
- Huang, F. H., J. M. Al-Khayri & E. D. E. Grur.** 1994. Micropropagation of *Acacia mearnsil*. *In vitro Cell Development Biology* 30: 70-74.
- Jaiwal, P. K. & A. Gulati.** 1991. *In vitro* high frequency plant regeneration of a tree legume *Tamarindus indica* (L.). *Plant Cell Report* 10: 569-573.
- Johansen, D. A.** 1940. *Plant Microtechnique*. Mc. Graw-Hill Book Co. Inc. New York. 523 pp.
- Kapoor, S. & S. C. Gupta.** 1986. Rapid *in vitro* differentiation of *Sesbania bispinosa* plants –a leguminous shrub. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 7: 263-268.
- Khattar, S. & H. Y. Mohan Ram.** 1982. Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in *Sesbania sesban*, a leguminous shrub. *Indian Journal Experimental Biology* 20: 216-219.
- Khattar, S. & H. Y. Mohan Ram.** 1983. Organogénesis and plantlet formation *in vitro* in *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Indian Journal Experimental Biology* 21: 251-253.
- Lakshman, Rao P. V. & D. N. De.** 1987. Tissue culture propagation of tree legumes *Albizia lebeck* (L.) Benth. *Plant Cell Report* 51: 266-268.
- Lakshmi Sita, G., C. Chattopadhyay & D. H. Tejavathi.** 1986. Plant regeneration from shoot callus of rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Plant Cell Report* 5: 266-268.
- Lakshmi Sita, G. & B. V. Raghava Swamy.** 1992. Application of cell and tissue culture technology for mass propagation of elite trees with special reference to rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Indian Forestry* 118: 36-47.
- Merkle, S. A. & A. T. Wiecko.** 1989. Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. *Canadian Journal Forestry Resources* 19: 285-288.
- Mittal, A., R. Agarwal & S. C. Gupta.** 1989. *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis*-a leguminous tree. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 19: 65-70.
- Mukhopadhyay, A. & H. Y. Mohan Ram.** 1981. Regeneration of plantlets from excised roots of *Dalbergia sisoo*. *Indian Journal of Experimental Biology* 19: 1113-1115.
- Murashige, T. & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473.
- Pérez Molphe Balch, E. M., R. Ramírez Malagón, H. G. Núñez Palenius & N. Ochoa Alejo.** 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguas Calientes 179 pp.
- Rao, M. M. & G. Lakshmi Sita.** 1996. Direct somatic embryogenesis from immature embryos of rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Plant Cell Report* 15: 355-359.
- Ravishnkar Rai, V. & K. S. Jagadishchandra.** 1988. *In vitro* regeneration plantlets from shoot callus of mature trees of *Dalbergia latifolia*. *Plant*

- Cell Tissue and Organ Culture 13: 77-83.
- Sarita, P., S. P. Bhatnagar & S. S. Bhojwani.** 1988. Preliminary investigations of micropropagation of a leguminous timber tree. *Pterocarpus santalinus*. Phytomorphology 38: 41-45.
- Shanker, S. & H. Y. Mohan Ram.** 1990. Plantlet regeneration from tissue cultures of *Sesbania grandiflora*. Current Science 59: 39-43.
- Sinha, R. K. & R. Mallick.** 1991. Plantlets from somatic callus tissue of the woody legume *Sesbania bispinosa* (Jacq.) WF. Wight. Plant Cell Report 10: 247-250.
- Skoleman, R. G. & M. O. Mapes.** 1976. *Acacia koa* gray plantlets from somatic callus tissue. Journal Heredity 67: 114-115.
- Thorpe, T. A.** 1995. *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, pp. 471-541.
- Tomar, U. K. & S. C. Gupta.** 1988. *In vitro* plant regeneration of leguminous tree (*Albizia* spp.). Plant Cell Report 7: 385-388.
- Trigiano, R. N., R. M. Beaty & E. T. Graham.** 1988. Somatic embryogenesis from immature embryos of redbud (*Cercis canadensis*). Plant Cell Report 7: 148-150.
- Trigiano, R. N., R. M. Beaty & J. T. F. Dietrich.** 1989. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Cornus florida*. Plant Cell Report 8: 270-273.
- Trigiano, R. N., R. L. Geneve & S.A. Merckle.** 1992. Tissue and cell culture of woody legumes. Horticultural Review 14: 265-331.
- Trigiano, R. N., R. L. Geneve & L. G. Buckley.** 1995. Somatic embryogenesis in eastern redbud (*Cercis canadensis*). En: S. Jain; P. Gupta & R. Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2: 471-482.
- Trigiano, R. N., K. Malueg & E. Graham.** 1996. Histological techniques. En: Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. Eds.: Trigiano, R. & Gray D. CRC Press. Chapter 4, Florida, USA.
- Upadhyay, S. & N. Chandra.** 1983. Shoot and plantlet formation in organ and callus cultures of *Albizia lebbbeck* Benth. Annals of Botany 52: 421-424.
- Vlachova, M., B. A. Metz, J. Schell & F. J. de Bruijn.** 1987. The tropical legume, *Sesbania rostrata*, Tissue Culture Plant Regeneration and infection with *Agrobacterium tumefaciens* and *rhizogenes* strains. Plant Science 50: 213-223.
- Weaver, L. A. & R. N. Trigiano.** 1991. Regeneration of *Cladrastis lutea* (Fabaceae) via somatic embryogenesis. Plant Cell Report 10: 183-186.