

Effects of the growth regulators for the induction of somatic embryos from different explants of *Echinocactus parryi* Engelm., an endemic and endangered species

Efectos de reguladores de crecimiento para inducción de embriones somáticos a partir de diferentes explantes de *Echinocactus parryi* Engelm., una especie endémica y amenazada

Dolores Adilene García-González¹; María del Socorro Santos-Díaz²; Juan Pedro Flores-Margez¹; Pedro Osuna-Ávila^{1*}

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas.

Av. Henry Dunant 4016. C. P. 32310. Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

²Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas.

Av. Manuel Nava 6. C. P. 78210. San Luis Potosí, México.

*Corresponding author: posuna@uacj.mx; tel.: +52 656 688 1800 ext. 1821.

Abstract

Introduction: The list of threatened species is enhancing and needs to integrate plant tissue culture tools with conventional techniques that support the appropriate management of these species.

Objective: To assess the effects of the growth regulators for the induction of somatic embryos from explants of *Echinocactus parryi* Engelm.

Materials and methods: A completely randomized design was utilized to evaluate three types of explants (mature seeds, shoots and green callus) cultured on basal Murashige & Skoog media (MS) with different growth regulators concentrations (2, 4-D [dichlorophenoxy acetic acid], BAP [6-benzylaminopurine] and kinetin). Histological analysis of the embryogenic structures was performed.

Results and discussion: The auxin 2, 4-D induced both embryogenic and organogenic callus from seeds and shoot explants. The globular stage did not evolve to their maturity, presumably because of 2, 4-D accumulation. The compact callus explants were the more efficient to induce 19.2 somatic embryos per explant when they were cultured in the medium with 0.5 mg·L⁻¹ kinetin. However, the latest phases did not germinate, probably due to abnormalities generated by genetic and epigenetic changes in the DNA that can cause abnormal somatic embryos. The histology image demonstrated that the globular and torpedo structures were visible under a microscope showing stained nucleus and numerous starch grains.

Conclusions: *E. parryi* is a species that can produce a high number of embryogenic structures, which represents a great potential to grow massive plants.

Keywords:
dichlorophenoxyacetic
acid; kinetin;
embryogenesis; tissue
culture; histological
analysis.

Resumen

Introducción: La lista de especies amenazadas está incrementando y necesita la integración de herramientas de cultivo de tejidos vegetales con técnicas convencionales que apoyen el manejo adecuado de dichas especies.

Objetivo: Evaluar los efectos de reguladores de crecimiento en la inducción de embriones somáticos a partir de explantes de *Echinocactus parryi* Engelm.

Materiales y métodos: Se utilizó un diseño completamente aleatorio para evaluar tres tipos de explantes (semillas maduras, brotes y callo verde) cultivados en medio basal Murashige & Skoog con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (2, 4-D [ácido diclorofenoxiacético], BAP [6-bencilaminopurina] y kinetina). Se realizó un análisis histológico de las estructuras embriónicas.

Resultados y discusión: La auxina 2, 4-D indujo callo embriónico y organogénico a partir de explantes de semillas y de brotes. La fase globular no evolucionó hasta su madurez, debido presumiblemente a la acumulación de 2, 4-D. Los explantes de callo compacto fueron los más eficientes para inducir 19.2 embriones somáticos por explante cuando se cultivaron en medio con 0.5 mg·L⁻¹ de kinetina; sin embargo, las últimas fases no germinaron, probablemente a causa de anomalías generadas por cambios genéticos y epigenéticos en el ADN que pueden causar embriones somáticos anormales. La imagen histológica demostró que las estructuras globulares y de torpedo fueron visibles al microscopio mostrando el núcleo teñido y numerosos granos de almidón.

Conclusiones: *E. parryi* es una especie que puede producir un número elevado de estructuras embriónicas, lo que representa un gran potencial para el cultivo masivo de plantas.

Palabras clave: ácido
diclorofenoxiacético;
kinetina; embriogénesis;
cultivo de tejidos;
análisis histológico.

Introduction

Cacti are one of the groups of plants more endangered in México due to illegal extraction and habitat destruction (Villanueva, 2016). *Echinocactus parryi* Engelm. is an endemic species from the municipality of Juárez, Chihuahua, México. Its ecosystem is characterized by rocky and gravelly slopes in a desert environment, mainly in xerophilous and crassicaule communities (Quiñónez et al., 2018). However, the illegal collection, mining, and extraction of construction materials have reduced the native populations (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2010). Ecological studies on the population conditions of *E. parryi* are scarce. This species is propagated for seed only so that natural propagation has limitations that imply problems with their seed viability. The growth of plants is too slow, limiting the restoration of wild populations.

An option to improve the populations of threatened species is the *in vitro* plant tissue culture. Somatic embryogenesis is the most efficient *in vitro* technique for mass propagation. It has an excellent application for genetic diversity compared to organogenesis (Salma, Kundu, Ali, & Mandal, 2019). Embryogenesis can be carried out in a short time without seasonal dependence (Santos-Díaz, Pérez-Molphe, Ramírez-Malagon, Núñez-Palenius, & Ochoa-Alejo, 2011). The induction of somatic embryos has many advantages over conventional direct organogenesis; for example, producing valuable plants, artificial seeds, transgenic plants, conservation of genetic resources, and somaclonal variation (Brand, Quimbaya, Tohme, & Chavarriaga-Aguirre, 2019; Quiroz-Figueroa, Rojas-Herrera, Galaz-Avalos, & Loyola-Vargas, 2006). Somatic embryogenesis has been induced for a broad type of species, but for cactus species, a few of them reported, such as *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Bouamama et al., 2011; Linhares et al., 2006; Kaaniche-Elloumi, Jeddi, Mahmoud, Chakroun, & Jemmali, 2015) and *Capiapoa tenuissima* Ritt. (Lema-Ruminska, 2011; Lema-Ruminska, Goncerzewicz, & Gabriel, 2013). The problem of maturity for somatic embryo and their germination is not common however the accumulation of 2, 4-D (dichlorophenoxy acetic acid) inside globular embryos is reported, affecting the internal levels of indol-3-acetic acid (IAA) and altering the polarization of the cells (García et al., 2019). It could affect the further embryo development and absence of apical meristem due to morphological abnormalities (Baskaran, & Van Staden, 2017; Nugent, Chandler, Whiteman, & Stevenson, 2001). Our recent studies in the *in vitro* clonal propagation of *E. parryi* showed the lower number of shoots (2.9 per explant) and the highest mass of callus formation, which limited the efficient clonal propagation (García-González, Santos-Díaz, Flores-Margez, & Osuna-Ávila, 2020). This study proposes the continuous exploration

Introducción

Las cactáceas son uno de los grupos de plantas más amenazados en México, debido a la extracción ilegal y destrucción de su hábitat (Villanueva, 2016). *Echinocactus parryi* Engelm. es una especie endémica del municipio de Juárez, Chihuahua, México. El ecosistema se caracteriza por laderas rocosas y gravosas en un ambiente desértico, principalmente en comunidades xerófilas y crasicaules (Quiñónez et al., 2018). No obstante, la recolección ilegal, la minería y la extracción de materiales de construcción han reducido las poblaciones nativas (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2010). Los estudios ecológicos sobre las condiciones poblacionales de *E. parryi* son escasos. Esta especie se multiplica solo por semilla, por lo que la propagación natural tiene limitaciones que implican problemas con la viabilidad; además, el crecimiento de las plantas es muy lento, lo que limita la restauración de las poblaciones silvestres.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una opción para mejorar poblaciones de especies en peligro. La embriogénesis somática es la técnica *in vitro* más eficiente para propagación masiva y tiene excelente aplicación para la diversidad genética en comparación con la organogénesis (Salma, Kundu, Ali, & Mandal, 2019). La embriogénesis puede llevarse a cabo en poco tiempo sin dependencia estacional (Santos-Díaz, Pérez-Molphe, Ramírez-Malagon, Núñez-Palenius, & Ochoa-Alejo, 2011). La inducción de embriones somáticos tiene muchas ventajas sobre la organogénesis directa convencional; por ejemplo, la producción de plantas valiosas, semillas artificiales, plantas transgénicas, conservación de recursos genéticos y variación somaclonal (Brand, Quimbaya, Tohme, & Chavarriaga-Aguirre, 2019; Quiroz-Figueroa, Rojas-Herrera, Galaz-Avalos, & Loyola-Vargas, 2006). La embriogénesis somática ha sido inducida para un amplio tipo de especies, pero en el caso de cactus se han reportado solo unas pocas como *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Bouamama et al., 2011; Linhares et al., 2006; Kaaniche-Elloumi, Jeddi, Mahmoud, Chakroun, & Jemmali, 2015) y *Capiapoa tenuissima* Ritt. (Lema-Ruminska, 2011; Lema-Ruminska, Goncerzewicz, & Gabriel, 2013). El problema de madurez para el embrión somático y su germinación no es común; sin embargo, se reporta la acumulación de 2, 4-D (ácido diclorofenoxiacético) dentro de los embriones globulares, que afecta los niveles internos de ácido indol-3-acético (IAA) y altera la polarización de las células (García et al., 2019). Esto podría afectar el desarrollo posterior del embrión y la ausencia de meristemo apical, a causa de anomalías morfológicas (Baskaran & Van Staden, 2017; Nugent, Chandler, Whiteman, & Stevenson, 2001). Estudios recientes en la propagación clonal *in vitro* de *E. parryi* mostraron el menor número de brotes (2.9 por explante) y la mayor masa de formación de callo, lo que

of this species and to study if the somatic embryo is more efficient than the clonal propagation route.

The use of auxins in the culture media is necessary to promote cell polarity and asymmetric cell division in the initiation of somatic embryogenesis (Yang, Wang, Le, & Dong, 2020). Typically, 2, 4-D synthetic auxin is used to induce or multiply somatic embryos that develop like zygotic embryos (Vondráková, Eliášová, Fischerová, & Vágner, 2011). The 6-furfurylaminopurine (kinetin) and 6-benzylaminopurine (BAP) promotes somatic embryo germination or shoot differentiation (Manokari, Latha, Priyadharshini, Jogam, & Shekhawat, 2020; Wu, Wei, Wang, & Wei, 2020). These cytokinins also function as a synergistic since combined with 2, 4-D to induce the somatic embryos (Anzidei, Benicci, Schiff, & Mori, 2000). The somatic embryos could be formed directly from the cells of the explant or indirectly from previous callus formation. First, the pro-embryogenic mass is promoted, and the subsequent somatic embryos are expressed on the peripheral of the callus (Alvez & Oropeza, 2015; Jhong, Pintado, & Jiménez, 2019). During the callus induction ploidy changes and mutations can occur (Bednarek & Orłowska, 2020). The regenerated plants coming from somatic embryos may exhibit the somaclonal variation (Torres-Silva et al., 2018). In the case of *E. parryi*, there are no reports of somatic embryogenesis, so it is necessary to elucidate whether this species has the embryogenic capacity, which would be a more efficient alternative for its propagation. Thus, the main objective of this work was to evaluate the effects of the growth regulators for the induction of somatic embryos from mature seeds, shoots, and compact green callus. Also, was established a histological analysis of the induced embryogenic structures.

Materials and methods

Indirect somatic embryo structures induction from different explants

Mature seed explants

Seeds of *E. parryi* were collected randomly from mature fruits of native plants in August 2018, located in the municipality of Juárez, Chihuahua, México. The fruits were placed in paper bags and transported to the laboratory of plant biotechnology in the Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Fruits longitudinally were dissected with scissors, and the seeds were placed in a paper bag in dark conditions with a temperature of 25 ± 1 °C until use. The seeds were sterilized with 50 % commercial bleach (Cloralex® 5 % sodium hypochlorite solution) for 15 minutes, rinsed with sterile distilled water, and soaked in sterile water for 24 h (García-González et al., 2020). Half of the seed coat was removed using tweezers and a scalpel in

limitó la propagación clonal eficiente (García-González, Santos-Díaz, Flores-Margez, & Osuna-Ávila, 2020). Este estudio propone la exploración continua de esta especie e investigar si el embrión somático es más eficiente que la vía de propagación clonal.

El uso de auxinas en el medio de cultivo es necesario para promover la polaridad celular y la división celular asimétrica en el inicio de la embriogénesis somática (Yang, Wang, Le, & Dong, 2020). Normalmente, la auxina sintética 2, 4-D se utiliza para la inducción o multiplicación de embriones somáticos que se desarrollan como embriones cigóticos (Vondráková, Eliášová, Fischerová, & Vágner, 2011). Por otra parte, la 6-furfurilaminopurina (kinetina) y 6-bencilaminopurina (BAP) promueven la germinación de embriones somáticos o la diferenciación de brotes (Manokari, Latha, Priyadharshini, Jogam, & Shekhawat, 2020; Wu, Wei, Wang, & Wei, 2020). Estas citoquininas también funcionan como sinérgicas, ya que combinadas con 2, 4-D inducen los embriones somáticos (Anzidei, Benicci, Schiff, & Mori, 2000), los cuales pueden formarse directamente a partir de células del explante o indirectamente a partir de la formación previa de callos. En estos, primero se promueve la masa proembriogénica y los posteriores embriones somáticos se expresan en la periferia (Alvez & Oropeza, 2015; Jhong, Pintado, & Jiménez, 2019). Durante la inducción del callo pueden producirse cambios de ploidía y mutaciones (Bednarek & Orłowska, 2020). Las plantas regeneradas de embriones somáticos pueden presentar variación somaclonal (Torres-Silva et al., 2018). En el caso de *E. parryi* no existen reportes de embriogénesis somática, por lo que es necesario dilucidar si esta especie tiene capacidad embriogénica, lo que sería una alternativa más eficiente para su propagación. Por tanto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar los efectos de reguladores de crecimiento para la inducción de embriones somáticos a partir de semillas maduras, brotes y callos verdes compactos. Asimismo, se realizó un análisis histológico de las estructuras embriogénicas inducidas.

Materiales y métodos

Inducción indirecta de estructuras de embriones somáticos a partir de diferentes explantes

Explantes de semillas maduras

En agosto de 2018 se colectaron al azar semillas de *E. parryi* de frutos maduros de plantas nativas en el municipio de Juárez, Chihuahua, México. Los frutos se colocaron en bolsas de papel y se llevaron al laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Los frutos se diseccionaron longitudinalmente con tijeras y las semillas se colocaron en una bolsa de papel en la oscuridad a 25 ± 1 °C hasta su uso. Las semillas se esterilizaron con cloro

sterile conditions. Ten scarified seeds per jar and each treatment were germinated in basal culture media MS (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 2, 4-D at 0, 2, 4, and 6 mg·L⁻¹ for callus induction. The embryogenic callus was estimated as the percentage of globular structures in the callus after 60 days. The callus maintained for 60 days were subcultured every 30 days in MS medium with the same concentrations of 2, 4-D. The embryogenic and non-embryogenic callus formation, color, and number of regenerated shoots were registered after 120 days.

Seedling explants

Sterile seedlings from seed germination, with 40 days of *in vitro* culture, were used as explants. The seedlings were dissected in three sections: apical, middle, and basal (the root was removed). Thirty-six explants per section were placed in Petri dishes containing 15 mL of basal MS culture media supplemented with 0, 2, 4, and 6 mg·L⁻¹ 2, 4-D to induce embryogenic callus formation. The induced calli were divided randomly into 27 pieces per treatment and subcultured three times every 30 days in the same culture medium. After 90 days, the callus bearing globular structures (27 pieces of 1-2 cm) were transferred to MS with 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg·L⁻¹ of 2, 4-D, BAP and kinetin (K) (Caisson Labs). The morphogenetic response and the color of the callus were evaluated after 120 days.

Compact green callus explants

Green compact calli from shoot apex and cultivated in different BAP concentrations for 30 weeks came from previous micropropagation *in vitro* experiments used for this study. Nine calli (1-2 cm size) explants per treatment were placed on Petri dishes (100 x 15 mm) containing 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D, BAP or K, to compare their effect on somatic embryogenesis induction. The experiments were evaluated after 30 days with the imaging software NIS-Elements (Nikon) to count somatic embryos.

The three types of explants were incubated in a bioclimatic chamber light with photoperiod conditions (16 hours light). The fluorescent light bulbs gave the intensity of light (5 000 lux) at 25 ± 2 °C. The calli were observed under the stereoscope Nikon SMZ 800 to identify shoots or somatic embryos. The images were taken with a stereomicroscope attached to a Nikon Digital Sight DS-Fi2 camera.

Histology analysis

Histological analyses were performed on calli containing shoots, globular, and torpedo stages to verify the typical bipolar structure of somatic embryos. The sections were dissected using tweezers and a

comercial al 50 % (Cloralex® solución de hipoclorito de sodio al 5 %) durante 15 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron en agua estéril durante 24 h (García-González et al., 2020). La mitad de la cubierta seminal se retiró con pinzas y bisturí esterilizados. Diez semillas escarificadas por frasco en cada tratamiento germinaron en medio de cultivo basal MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 2, 4-D a 0, 2, 4 y 6 mg·L⁻¹ para inducción de callo. El callo embriogénico se estimó como el porcentaje de estructuras globulares después de 60 días. Los callos mantenidos durante 60 días se subcultivaron cada 30 días en medio MS con las mismas concentraciones de 2, 4-D. Se hizo un registro de la formación de callo embriogénico y no embriogénico, el color y el número de brotes regenerados después de 120 días.

Explantos de plántulas

Plántulas estériles procedentes de la germinación de semillas con 40 días de cultivo *in vitro* se utilizaron como explantes. Las plántulas se diseccionaron en tres secciones: apical, media y basal (se eliminó la raíz). Treinta y seis explantes por sección se colocaron en cajas de Petri con 15 mL de medio de cultivo basal MS suplementado con 0, 2, 4 y 6 mg·L⁻¹ de 2, 4-D para inducir la formación de callo embriogénico. Los callos inducidos se dividieron al azar en 27 piezas por tratamiento y se subcultivaron tres veces cada 30 días en el mismo medio de cultivo. Después de 90 días, los callos con estructuras globulares (27 piezas de 1 a 2 cm) se transfirieron a MS con 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg·L⁻¹ de 2, 4-D, BAP y kinetina (K) (Caisson Labs). La respuesta morfogénica y el color del callo se evaluaron después de 120 días.

Explantos de callos verdes compactos

Los callos verdes compactos del ápice del brote y cultivados en diferentes concentraciones de BAP durante 30 semanas procedieron de experimentos previos de micropropagación *in vitro* utilizados para este estudio. Nueve explantes de callos (1 a 2 cm) se utilizaron por tratamiento en cajas Petri (100 x 15 mm) con 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg·L⁻¹ de 2, 4-D, BAP o K, para comparar su efecto en la inducción de embriogénesis somática. Los experimentos se evaluaron después de 30 días utilizando el *software* de imágenes NIS-Elements (Nikon) para el conteo de embriones somáticos.

Los tres tipos de explantes se incubaron en una cámara de luz bioclimática con fotoperiodo (16 horas luz). Las bombillas fluorescentes proporcionaron la intensidad de luz (5 000 lux) a 25 ± 2 °C. Los callos se observaron bajo el estereoscopio Nikon SMZ 800 para la identificación de brotes o embriones somáticos. Las imágenes se tomaron con un estereomicroscopio acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi2.

scalpel observed with a stereoscope. The samples were fixed in FAA (formalin 4 %, acetic acid, alcohol using 1:1:1 proportion) during 48 hours at room temperature. After fixation, the samples were dehydrated in ethanol solutions (80, 90, and 100 %) and xylol, and finally were embedded in paraffin (Tissue-Tek). Later the 5 μ m sections were cut using a rotatory microtome (Microm HM 325) and stained with blue toluidine 1 % for 10 minutes. The samples were observed in an optical microscope Nikon Eclipse Ni.

Statistical analysis

Because of wide scatter in the data, including zero values, the log transformation $\ln(x+1)$ was used to include zero during transformation to approximate the data to the normal distribution. For mature seeds, the effect of 2,4-D treatments on embryogenic callus, percent of callus, and number of shoots was evaluated by analysis of variance to identify significant differences. The experiment was a completely randomized design using the univariate GLM procedure; subsequently, a Tukey test was performed to compare means. Embryogenic callus data in seedling explants were analyzed using a factorial arrangement where the factors were 2, 4-D at four levels (0, 2, 4 and 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and explant section at three levels (apical, middle and basal); in addition, a Tukey's comparison of means was used since main effects and interaction were significant. The number of somatic embryos per green callus explant under the 2,4-D, BAP and kinetin treatments at four levels (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), with no interaction in this case, was analyzed in a completely randomized design. All significance was at the 95 % confidence limit ($P < 0.05$) using SPSS software version 25 (IBM Corp., 2017).

Results and discussion

Indirect somatic embryo structures induction from different explants

Mature seed explants

The incipient callus was white and derived directly from the cotyledon after 20 days of culture. Later, the callus presented intense pink, light green, and white areas. The ANOVA transformed data displayed that 2, 4-D had a significant difference in the embryogenic callus percentage than control (Table 1). After 60 days of culture, globular embryogenic structures were observed in the peripheral of the calli in all the 2, 4-D concentrations tested (Table 2). The subculture of embryogenic callus in media with or without 2, 4-D at 120 days did not promote their maturation.

The globular structures in *E. parryi*, probably did not evolve to the more advanced stages because of 2, 4-D

Análisis histológico

Los análisis histológicos se llevaron a cabo en callos con brotes, fase globular y de torpedo para verificar la estructura bipolar típica de los embriones somáticos. Las secciones se cortaron con pinzas y bisturí y se observaron con un estereoscopio. Las muestras se fijaron en FAA (formalina 4 %, ácido acético, alcohol en proporción 1:1:1) durante 48 h a temperatura ambiente. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en soluciones de etanol (80, 90 y 100 %) y xilol y, finalmente, se insertaron en parafina (Tissue-Tek). Posteriormente, las secciones de 5 μ m se cortaron con un micrótopo rotatorio (Microm HM 325) y se tiñeron con toluidina azul al 1 % durante 10 minutos. Las muestras se observaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni.

Análisis estadístico

Debido a una amplia dispersión de los datos, incluidos los valores cero, se utilizó la transformación logarítmica $\ln(x+1)$ para incluir el cero durante la transformación y así aproximar los datos a la distribución normal. En las semillas maduras, el efecto de los tratamientos de 2, 4-D sobre el callo embriogénico, el porcentaje de callo y el número de brotes se evaluó mediante análisis de varianza para identificar diferencias significativas. El experimento fue un diseño completamente aleatorio que utilizó el procedimiento univariante GLM; posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias. Los datos del callo embriogénico en explantes de plántulas se analizaron utilizando un arreglo factorial donde los factores fueron 2, 4-D en cuatro niveles (0, 2, 4 y 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y la sección de explante en tres niveles (apical, medio y basal); además, se utilizó una comparación de medias de Tukey ya que los efectos principales y la interacción fueron significativos. El número de embriones somáticos por explante de callo verde bajo los tratamientos 2, 4-D, BAP y kinetina en cuatro niveles (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sin interacción en este caso, se analizó en un diseño completamente aleatorio. Toda la significancia se situó en el límite de confianza de 95 % ($P < 0.05$) utilizando el programa SPSS versión 25 (IBM Corp., 2017).

Resultados y discusión

Inducción indirecta de estructuras de embriones somáticos a partir de diferentes explantes

Explantes de semillas maduras

El callo incipiente fue de color blanco y derivó directamente del cotiledón después de 20 días de cultivo. Posteriormente, el callo presentó áreas de color rosa intenso, verde claro y blanco. Los datos transformados por el ANOVA mostraron que 2, 4-D

Table 1. Analysis of variance for embryogenic callus and callus formation in mature seed explants of *Echinocactus parryi* under 2, 4-D treatments.

Cuadro 1. Análisis de varianza para callo embriogénico y formación de callo en explantes de semillas maduras de *Echinocactus parryi* bajo tratamientos con 2, 4-D.

Source/ Fuente	df/GL	Callus/Callo			Embryogenic callus/ Callo embriogénico		
		MS/CM	F	P	MS/CM	F	P
2, 4-D	3	0.295	2.25	0.099	50.310	37834	0.000
Error	36	0.131			0.001		
Total	39						

df = degrees of freedom; MS = mean square.

GL = grados de libertad; CM = cuadrado medio.

Table 2. Effect of treatment with 2, 4-D in callus and embryogenic callus formation from mature seeds explants of *Echinocactus parryi* at 60 days of *in vitro* culture.

Cuadro 2. Efecto del tratamiento con 2, 4-D en la formación de callo y callo embriogénico a partir de explantes de semillas maduras de *Echinocactus parryi* a los 60 días de cultivo *in vitro*.

2, 4-D (mg·L ⁻¹)	No. seeds/ Núm. semillas	Callus (%)/ Callo (%)	Transformed means/ Medias transformadas ln (x+1)	Embryogenic callus (%)/ Callo embriogénico (%)	Transformed means/ Medias transformadas ln (x+1)
0	10	80 a	2.375	0 b	0
2.0	10	100 a	2.718	89.0 ± 1.2 a	4.487
4.0	10	100 a	2.718	88.5 ± 1.0 a	4.487
6.0	10	100 a	2.718	89.0 ± 1.2 a	4.487

Average values ± standard error. Means with different letters are statistically different between concentrations of 2, 4-D based on Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Valores medios ± error estándar. Medias con letras diferentes son estadísticamente distintas entre concentraciones de 2, 4-D con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

accumulation, occurring inside the globular embryos. The auxin 2, 4-D in the culture medium induces an embryogenic response associated with the increase of the endogenous levels of IAA and the polar transport, which is needed for the formation of the apical-basal axis (Garcia et al., 2019). Consequently, morphological abnormalities can occur, like the absence of apical meristem that could affect further embryo development (Baskaran & Van Staden, 2017; Nugent, Chandler, Whiteman, & Stevenson, 2001). In this study, the 2, 4-D treatments promoted embryogenic callus being the globular phase the dominant structure without reaching the next heart stage of maturity. Similar results were reported by Pinheiro, Soares, and Arnholdt-Schmitt (2001), which obtained globular structures from *O. ficus-indica*, incapable of regenerating plants. It suggested that probably this response is due to a deficiency in the supplemented carbohydrates in the culture media. However, Vondráková et al. (2011) found that the developed somatic embryos of *Abies alba* Mill. cultivated with 2, 4-D failed to complete their maturation. However, the embryogenic callus from *Mediocractus coccineus* (DC.) Britton et Rose induced

produjo efecto significativo en el porcentaje de callo embriogénico comparado con el testigo (Cuadro 1). Después de 60 días de cultivo, se observaron estructuras embriogénicas globulares en la periferia de los callos en todas las concentraciones de 2, 4-D (Cuadro 2). El subcultivo de callos embriogénicos en medios con o sin 2, 4-D a 120 días no promovió su maduración.

Las estructuras globulares en *E. parryi* probablemente no hayan pasado a las etapas más avanzadas debido a la acumulación de 2, 4-D, la cual se produce en el interior de los embriones globulares. La auxina 2, 4-D, en medio de cultivo, induce una respuesta embriogénica asociada al aumento de los niveles endógenos de IAA y al transporte polar necesario para la formación del eje apical-basal (García et al., 2019). En consecuencia, pueden producirse anomalías morfológicas como la ausencia de meristemo apical que podría afectar el desarrollo posterior del embrión (Baskaran & Van Staden, 2017; Nugent, Chandler, Whiteman, & Stevenson, 2001). En este estudio, los tratamientos con 2, 4-D favorecieron el callo embriogénico siendo la fase globular la estructura dominante sin alcanzar

globular structures that turn onto a more defined cotyledonal stage (Infante, 1992). Stuppy and Nagl (1992) also induced embryogenic green callus from *Ariocarpus retusus* Scheidw. and after four months, the first somatic embryo appeared in the cotyledonary phase.

E. parryi non-embryogenic calli were also promoted and generated the shoot formation with trichomes (Figure 1). The ANOVA transformed data showed that 2, 4-D had a significant difference ($P = 0.007$) in the shoot number compared to the control. The Tukey mean comparison ($P \leq 0.05$) for shoot number was superior in medium with $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D after 120 days (Table 3). Thus *E. parryi* calli were able to form organogenic and embryogenic calli. The number of indirect shoot regeneration depends on the plant genotype and the addition of plant growth regulators (Asad et al., 2019; Baskaran, Kumari, Naidoo, & Van Staden, 2016). For example, Pedda et al. (2019) used BAP $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ANA (1-naphthaleneacetic acid) $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in *Hylocereus costaricensis* (F. A. C. Weber)

el siguiente estado de maduración (fase corazón). Pinheiro, Soares, y Arnholdt-Schmitt (2001) también obtuvieron estructuras globulares de *O. ficus-indica* incapaces de regenerar plantas. Probablemente, esta respuesta se deba a una deficiencia en los carbohidratos suplementados en los medios de cultivo. Por su parte, Vondrákova et al. (2011) encontraron que los embriones somáticos de *Abies alba* Mill. cultivados con 2, 4-D no lograron completar su maduración. En contraste, el callo embriogénico de *Mediocactus coccineus* (DC.) Britton et Rose indujo estructuras globulares que se convierten en una etapa cotiledonal más definida (Infante, 1992). Stuppy y Nagl (1992) también indujeron callo verde embriogénico de *Ariocarpus retusus* Scheidw. y después de cuatro meses apareció el primer embrión somático en la fase cotiledonaria.

Los callos no embriogénicos de *E. parryi* también se estimularon y generaron la formación de brotes con tricomas (Figura 1). Los datos transformados por el ANOVA mostraron que 2, 4-D causó diferencia significativa ($P = 0.007$) en el número de brotes en

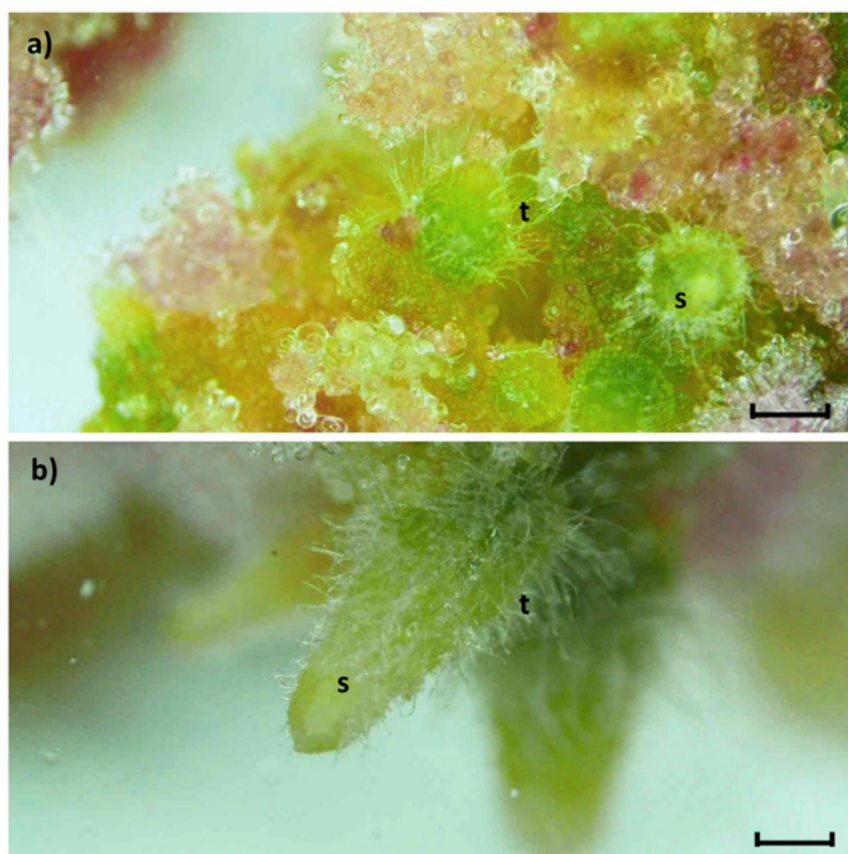


Figure 1. Regenerated shoots of *Echinocactus parryi* on subcultivated callus at 60 days of *in vitro* culture. a) massive rounded shoots (s) with trichomes (t) in the periphery of the callus, with 2,4-D $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. b) elongated shoots (s) showing trichomes (t) with kinetin $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The bars represent $1\,000 \mu\text{m}$ (1X).

Figura 1. Brotes regenerados de *Echinocactus parryi* sobre callo subcultivado a los 60 días de cultivo *in vitro*: a) brotes masivos redondos (s) con tricomas (t) en la periferia del callo con 2,4-D a $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; b) brotes alargados (s) mostrando tricomas (t) con kinetina a $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Las barras representan $1\,000 \mu\text{m}$ (1X).

Table 3. Effect of treatment with 2, 4-D in subcultivated callus from mature seed explants of *Echinocactus parryi* at 120 days of *in vitro* culture.

Cuadro 3. Efecto del tratamiento con 2, 4-D en callos subcultivados a partir de explantes de semillas maduras de *Echinocactus parryi* a los 120 días de cultivo *in vitro*.

2, 4-D (mg·L ⁻¹)	No. callus / Núm. callos	Shoot number / Núm. brotes	Shoot mean / Media de brotes	Transformed means ln (x+1) / Medias transformadas ln (x+1)
0	27	0	0 b	0
2.0	27	48	0.791 ± 0.15 a	0.230
4.0	27	17	0.259 ± 0.18 ab	0.438
6.0	27	32	0.550 ± 0.12 ab	0.583

Average values ± standard error. Means with different letters are statistically different according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Valores medios ± error estándar. Medias con letras diferentes son estadísticamente distintas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Britton et Rose, and produced 13.2 shoots. In contrast, Wakhlu and Bhau (2000) reported 23.6 shots from callus using K 1.3 mg·L⁻¹ in *Coryphantha elephantidens* Lem. The presence of trichomes in the shoots is considered a morphological marker which excludes the possibility that they are somatic embryos (Saptari & Susila, 2019).

Seedling explants

The ANOVA transformed data showed that 2, 4-D at four levels, the type of explant at three levels as main effects and their interactions were significant for embryogenic callus formation (Table 4). The Tukey's comparison of means ($P \leq 0.05$) indicated that embryogenic callus induction was higher in the middle explant section (30.86 ± 0.40) and in the 2, 4-D treatment at 6 mg·L⁻¹, after 30 days of *in vitro* culture (Table 5). The apical, middle and basal sections of seedlings were competent to produce embryogenic callus at all evaluated concentrations of 2, 4-D compared to the control. The best interaction response was observed at all concentrations evaluated with the middle section explant (100 % embryogenic callus) and basal section explant with 2 and 6 mg·L⁻¹ of 2, 4-D (100 % and 92.9 ± 0.04 embryogenic callus, respectively). These explants showed globular structures after 30 days of *in vitro* culture (Table 6).

The apical section still preserved a high percentage of intact tissue (Figure 2). The globular structures were white, green, and pink color varying from light to intense. After 120 days of culture, the globular stage did not evolve towards mature embryo development. The auxin 2, 4-D is hard to eliminate and stays in this tissue for an extended period. The more exposed the somatic embryos with this potent auxin can promote many abnormal embryos which cannot reach the following stages in some plant species (Garcia et al., 2019). Contrary, Osuna and Barrow (2004) observed that the shoot apexes of *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr., cultivated with 2, 4-D or Dicamba (6-dichloro-o-anisic

comparación con el testigo. La comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) indicó que el número de brotes fue superior en medio de cultivo con 2.0 mg·L⁻¹ de 2, 4-D después de 120 días (Cuadro 3). Así, los callos de *E. parryi* fueron capaces de formar callos organogénicos y embriogénicos. El número de regeneración indirecta de brotes depende del genotipo de la planta y de la adición de reguladores de crecimiento vegetal (Asad et al., 2019; Baskaran, Kumari, Naidoo, & Van Staden, 2016). Por ejemplo, Pedda et al. (2019) utilizaron BAP a 3.0 mg·L⁻¹ + ANA (ácido 1-naftalenacético) 0.5 mg·L⁻¹ en *Hylocereus costaricensis* (F. A. C. Weber) Britton et Rose, y produjeron 13.2 brotes. En cambio, Wakhlu y Bhau (2000) reportaron 23.6 brotes del callo utilizando K a 1.3 mg·L⁻¹ en *Coryphantha elephantidens* Lem. La presencia de tricomas en brotes se considera un marcador morfológico que excluye la posibilidad de que sean embriones somáticos (Saptari & Susila, 2019).

Explantes de plántulas

Los datos transformados del ANOVA mostraron que 2, 4-D en cuatro niveles, el tipo de explante en tres niveles como efectos principales y sus interacciones fueron significativos para la formación de callo embriogénico (Cuadro 4). La comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) indicó que la inducción de callo embriogénico fue mayor en los explantes de la sección media (30.86 ± 0.40) y en el tratamiento 2, 4-D a 6 mg·L⁻¹, después de 30 días de cultivo *in vitro* (Cuadro 5). Las secciones apical, media y basal de las plántulas fueron competentes para producir callo embriogénico en todas las concentraciones evaluadas de 2, 4-D en comparación con el testigo. La mejor respuesta de interacción se observó en todas las concentraciones evaluadas con explante de la sección media (100 % de callo embriogénico) y en el explante de la sección basal con 2 y 6 mg·L⁻¹ de 2, 4-D (100 % y 92.9 ± 0.04 de callo embriogénico, respectivamente). Estos explantes mostraron estructuras globulares después de 30 días de cultivo *in vitro* (Cuadro 6).

Table 4. Analysis of variance for embryogenic callus data of *Echinocactus parryi* in different seedling explant sections and 2, 4-D treatments.

Cuadro 4. Análisis de varianza para datos de callo embriogénico de *Echinocactus parryi* en diferentes secciones de explantes de plántulas y tratamientos de 2, 4-D.

Source/Fuente	df/GL	MS	F	P
Explant/Explante	2	11.57	643.3	0.000
2, 4-D	3	116.10	6 451.2	0.000
Explant*2, 4-D/ Explante*2, 4-D	6	2.10	116.8	0.000
Error	96	0.01		
Total	107			

df = degrees of freedom; MS = mean square.

GL = Grados de libertad; MS = cuadrado medio.

Table 5. Main effect of seedling explant section and 2, 4-D on the percentage of embryogenic callus formation of *Echinocactus parryi* at 30 days of *in vitro* culture.

Cuadro 5. Efecto principal de la sección del explante de plántulas y del 2, 4-D sobre el porcentaje de formación de callo embriogénico de *Echinocactus parryi* a los 30 días de cultivo *in vitro*.

Factor	Embryogenic callus (%) / Callo embriogénico (%)	Data transformed ln (x+1) / Datos transformados ln (x+1)
Explant/Explante		
Apical	10.51 ± 0.28 c	2.4436
Medium/Media	30.86 ± 0.40 a	3.4613
Basal	28.55 ± 0.39 b	3.3860
2, 4-D (mg·L ⁻¹)		
0	0 ± 0 d	0
2	58.83 ± 0.16 c	4.0916
4	49.08 ± 0.19 b	3.9136
6	79.05 ± 0.06 a	4.3827

± standard error (n = 36). Means with different letters are statistically different between explant sections and between doses of 2, 4-D based on Tukey's test ($P \leq 0.05$).

± error estándar de la media (n = 36). Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes entre secciones de explante y entre dosis de 2, 4-D con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Table 6. Effect of the interaction of 2, 4-D treatment and seedling explant section on the percentage of embryogenic callus formation of *Echinocactus parryi* at 30 days of *in vitro* culture.

Cuadro 6. Efecto de la interacción del tratamiento con 2, 4-D y de la sección de explante de plántulas sobre el porcentaje de formación de callo embriogénico de *Echinocactus parryi* a los 30 días de cultivo *in vitro*.

2, 4-D (mg·L ⁻¹)	Explant/Explante	Embryogenic callus (%) / Callo embriogénico (%)	Transformed means / Medias transformadas ln (x+1)
0	Apical	0 ± 0 e	0
2	Apical	20.0 ± 0 d	3.044
4	Apical	14.5 ± 0.10 d	2.738
6	Apical	53.1 ± 0.03 c	3.991
0	Medium/Medio	0 ± 0 e	0
2	Medium/Medio	100 ± 0 a	4.615
4	Medium/Medio	100 ± 0 a	4.615
6	Medium/Medio	100 ± 0 a	4.615
0	Basal	0 ± 0 e	0
2	Basal	100 ± 0 a	4.615
4	Basal	79.4 ± 0.12 b	4.387
6	Basal	92.9 ± 0.04 ab	4.542

± standard error of the mean (n = 9). Means with different letters are statistically different according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

± error estándar de la media (n = 9). Medias con letras diferentes son estadísticamente distintas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

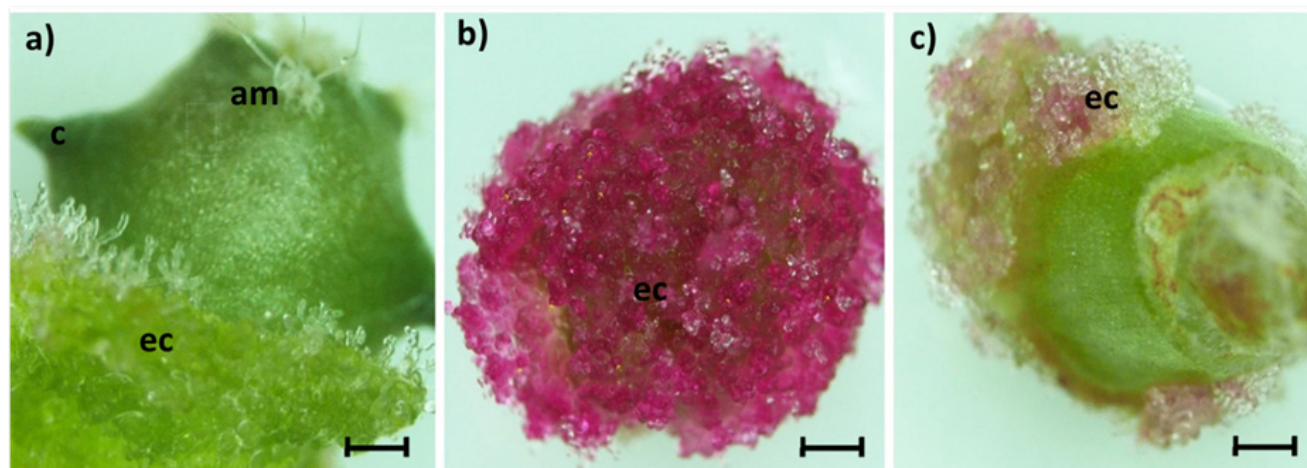


Figure 2. Response of apical, middle, and basal section of seedling explants of *Echinocactus parryi* after 30 days of culture. a) high cell division and embryogenic callus (ec) and shoot apex with intact tissue: apical meristem (am), cotyledons (c), and embryogenic callus (ec). b) middle section shows the embryogenic callus (ec) covering 100 % of the original tissue. c) basal section with embryogenic callus (ec) just in the cut part of the explant. The bars represent 1 000 μm (1X).

Figura 2. Respuesta de sección apical, media y basal de explantes de plántulas de *Echinocactus parryi* después de 30 días de cultivo. a) Alta división celular y callo embriogénico (ce) y ápice del brote con tejido intacto: meristemo apical (am), cotiledones (c) y callo embriogénico (ce). b) La sección media muestra callo embriogénico (ce) cubriendo 100 % del tejido original. c) Sección basal con callo embriogénico (ce) justo en la parte cortada del explante. Las barras representan 1 000 μm (1X).

acid) for six weeks, the somatic embryos progressed from the globular to mature embryos resembled those naturally developed in seeds.

Compact green callus explants

In the case of *E. parryi* compact green callus (30 weeks old) cultivated in 2, 4-D, BAP and K, the data showed that only callus grown in medium with 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ K, promoted the highest number of somatic embryos after 30 days of culture. This treatment induced a mean of 19.2 embryos per explant. In contrast, the calli cultured on BAP or 2, 4-D treatments did not generate somatic embryos or shoots. The results indicated that compact green calli in *E. parryi* can produce somatic embryos without synthetic auxins. Also, Al-Dein, Al-Ramamneh, Sriskandarajah, and Serek (2006) used 1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ K to achieve somatic embryos in globular, torpedo, and cotyledonal stage from *Schlumbergera truncata* (Haw.) Moran.

The somatic embryos of *E. parryi* were easily distinguished due to the typical white color, highly contrasting from the green color of the callus. The white color indicates the presence of carbohydrates and protein, essential for embryo development and germination in *Ledebouria ovatifolia* (Bak.) Jess. (Baskaran et al., 2016). The same characteristics were reported in *Santalum album* L. (Rugkhla & Jones, 1998), *O. ficus-indica* (Linhares et al., 2006), *Zingiber officinale* Rosc.

La sección apical conservó un alto porcentaje de tejido intacto (Figura 2). Las estructuras globulares tuvieron color blanco, verde y rosa que variaba de claro a intenso. Tras 120 días de cultivo, la fase globular no evolucionó hacia un desarrollo embrionario maduro. La auxina 2, 4-D es difícil de eliminar y permanece en este tejido durante un periodo prolongado. La exposición prolongada de los embriones somáticos a esta potente auxina puede promover numerosos embriones anormales, lo que no permite alcanzar las siguientes fases en algunas especies vegetales (García et al., 2019). Por el contrario, Osuna y Barrow (2004) observaron que en los ápices de los brotes de *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr., cultivados con 2, 4-D o Dicamba (ácido 6-dicloro-anísico) durante seis semanas, los embriones somáticos progresaron desde los globulares hasta los embriones maduros, asemejándose a los desarrollados naturalmente en las semillas.

Explantes de callos verdes compactos

En el caso de los callos verdes compactos de *E. parryi* (30 semanas) cultivados en 2, 4-D, BAP y K, los datos mostraron que solo los callos cultivados en medio con 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de K promovieron el mayor número de embriones somáticos después de 30 días de cultivo. Este tratamiento indujo una media de 19.2 embriones por explante. Por el contrario, los callos cultivados con tratamientos BAP o 2, 4-D no generaron embriones somáticos ni brotes. Los resultados indicaron que los

(Lincy, Remashree, & Sasikumar, 2009) and *Musa* sp. (Debbrama, Sudhakar, Kumar, & Soorianathasundaram, 2019). The somatic embryos of *E. parryi* were transferred to the MS culture media without plant growth regulators to induce their germination. After 30 days, the somatic embryos did not germinate, and the number of embryos decreased drastically by about 50 %. The no germination of the somatic embryos could be due to an ineffective maturation due to malformations of the meristems (Correia, Cunha, Slagueiro, & Canhoto, 2012). Garcia et al. (2019) claim that abnormalities generated by genetic changes in the DNA of somatic embryos are hardly anomalies reversible; however, abnormalities caused by epigenetic changes can be reversible and abnormal embryos can produce plants in most cases. In contrast, other cactus species had successful germination of somatic embryos in a basal MS culture media. Some examples are the *M. coccineus* (Infante, 1992), *Ariocarpus kostchoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Moebius-Goldamer, Mata-Rosas, & Chávez-Avila, 2003), *S. truncata* (Al-Dein et al., 2006), and *O. ficus-indica* (Bouamama et al., 2011).

The induction of somatic embryos is possible only in genetically reprogramed totipotent plant cells, and their morphology relates to zygotic embryos (Osuna & Barrow, 2004; Silveira et al., 2013; Wu et al., 2020). Each embryogenesis comprises four stages: globular, heart, torpedo, and cotyledonal (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Saptari & Susila, 2019). The somatic embryos of *E. parryi*, passed through all the stages at the same time (Figure 3). The achievement depends on the species and the supplementation of plant growth regulators. Kinetin had a more significant influence to induce all the somatic embryo phases than the rest of the treatments. Unfortunately, the latest stages did not germinate even though the compact calli were not cultured under 2, 4-D conditions. This lack of germination could be due to the plant genotype, which sometimes has ineffective maturation during the morphogenetic process. For example, the stored orchid somatic embryos (synthetic seeds) at different stages were germinated (91 %) on MS containing BAP and Kinetin at 0.5 mg·L⁻¹ each (Manokari et al., 2020). Regardless of somatic embryos have been induced in many plant species, there are still problems to be resolved in *E. parryi*.

Histology

The histological examination of the embryogenic callus samples showed the globular structures from seed explants (Figure 4). Figure 4a shows meristematic cells organized to form a globular embryo. The cells show intensely staining nuclei and thick cell walls. Meristematic cells are pluripotent and are the origin of the somatic embryos (Hui-Ju, Jen-Tsung, Hsiao-Hang, & Wei-Chin, 2018). In Figure 4b there are meristematic

callos verdes compactos de *E. parryi* pueden producir embriones somáticos sin auxinas sintéticas. Asimismo, Al-Dein, Al-Ramamneh, Sriskandarajah, y Serek (2006) utilizaron 1.5 mg·L⁻¹ de K para lograr embriones somáticos en estado globular, torpedo y cotiledón de *Schlumbergera truncata* (Haw.) Moran.

Los embriones somáticos de *E. parryi* se diferenciaron fácilmente debido al color blanco, muy contrastado con el color verde del callo. El color blanco indica la presencia de carbohidratos y proteínas esenciales para el desarrollo del embrión y la germinación en *Ledebouria ovatifolia* (Bak.) Jess. (Baskaran et al., 2016). Las mismas características se reportaron en *Santalum album* L. (Rugkhla & Jones, 1998), *O. ficus-indica* (Linhares et al., 2006), *Zingiber officinale* Rosc. (Lincy, Remashree, & Sasikumar, 2009) y *Musa* sp. (Debbrama, Sudhakar, Kumar, & Soorianathasundaram, 2019). Los embriones somáticos de *E. parryi* se transfirieron al medio de cultivo MS sin regulador de crecimiento vegetal para inducir su germinación. Después de 30 días, los embriones somáticos no germinaron y el número de embriones disminuyó drásticamente en aproximadamente 50 %. La no germinación de los embriones somáticos podría deberse a una maduración ineficaz debido a malformaciones de meristemos (Correia, Cunha, Slagueiro, & Canhoto, 2012). García et al. (2019) afirman que las anomalías generadas por cambios genéticos en el ADN de los embriones somáticos son difícilmente reversibles; sin embargo, las anomalías causadas por cambios epigenéticos pueden ser reversibles y los embriones anormales pueden producir plantas en la mayoría de los casos. Por el contrario, otras especies de cactus tuvieron una germinación exitosa de embriones somáticos en medio de cultivo basal MS. Algunos ejemplos son *M. coccineus* (Infante, 1992), *Ariocarpus kostchoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Moebius-Goldamer, Mata-Rosas, & Chávez-Avila, 2003), *S. truncata* (Al-Dein et al., 2006) y *O. ficus-indica* (Bouamama et al., 2011).

La inducción de embriones somáticos solo es posible en células vegetales totipotentes reprogramadas genéticamente y su morfología se relaciona con embriones cigóticos (Osuna & Barrow, 2004; Silveira et al., 2013; Wu et al., 2020). Cada embriogénesis comprende cuatro etapas: globular, corazón, torpedo y cotiledón (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Saptari & Susila, 2019). Los embriones somáticos de *E. parryi* pasaron por todas las etapas al mismo tiempo (Figura 3). El logro depende de la especie y la suplementación de reguladores de crecimiento vegetal. La kinetina tuvo influencia más significativa para inducir todas las fases del embrión somático que el resto de los tratamientos. Desafortunadamente, las últimas fases no germinaron a pesar de que los callos compactos no se cultivaron en condiciones de 2, 4-D. Esta falta de germinación podría

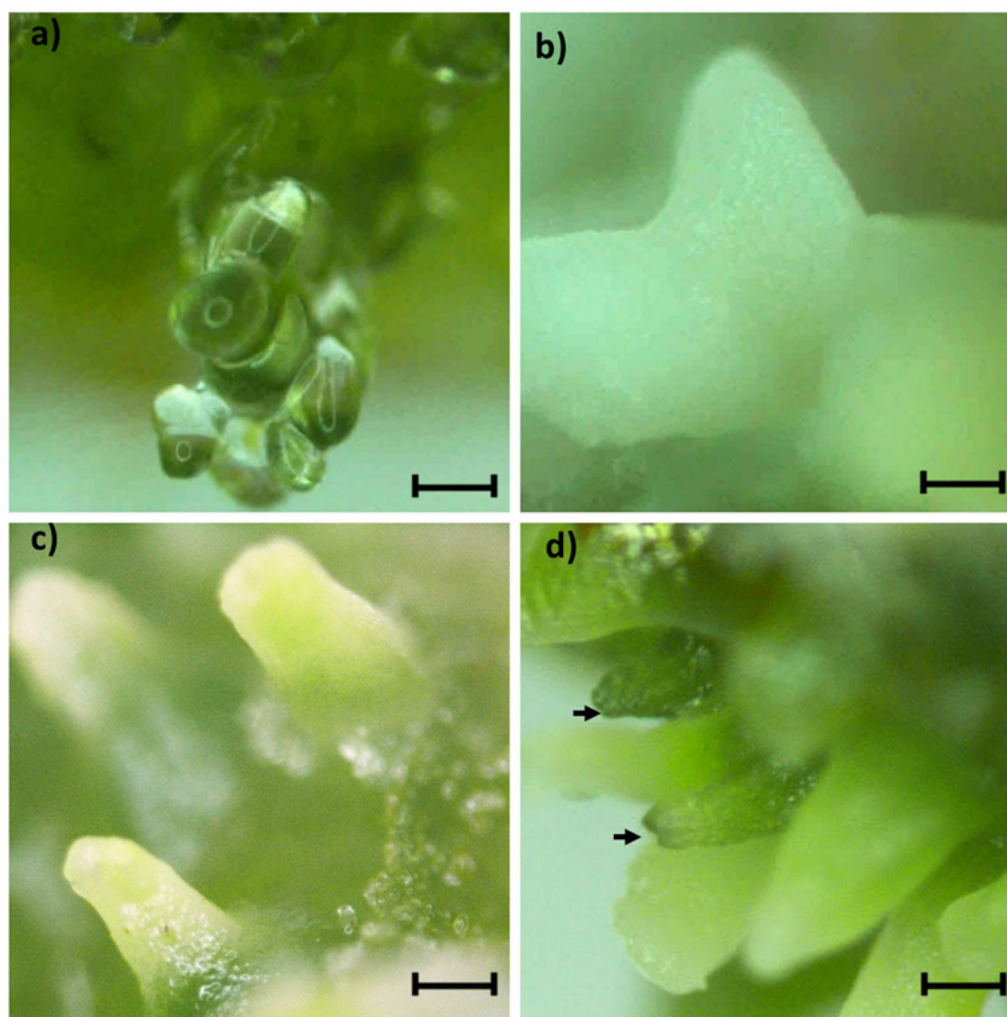


Figure 3. Stages of somatic embryogenesis in green compact calli of *Echinocactus parryi*: a) globular stage, b) heart, c) torpedo and d) cotyledonary stage (pointed with the arrows) at 40 days of *in vitro* culture in $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kinetin treatment. The bars represent $500 \mu\text{m}$ (4X).

Figura 3. Etapas de embriogénesis somática en callos compactos verdes de *Echinocactus parryi*: a) etapa globular, b) corazón, c) torpedo y d) etapa cotiledonaria (señalada con flechas) a los 40 días de cultivo *in vitro* en tratamiento con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kinetina. Las barras representan $500 \mu\text{m}$ (4X).

cells with a solid stained nucleus giving place to the formation of globular embryos. The protoderm were observed in an isolated globular embryo. The meristematic cells show a stained nucleus, dense cytoplasm, and starch grains (Figure 4c). The histological analysis revealed the tracheid cells in the vascular tissue surrounded by vacuolated cells (Figure 4d). Pinheiro et al. (2001) reported in *O. ficus-indica*, an unorganized tracheid structure observed in *E. parryi*, which probably means a disorder in endogenous metabolism and distribution auxin inside the cells that affect the maturation of the somatic embryos.

Figure 5 represents the longitudinal-section histological analysis of the generated somatic embryos from compact green callus. This analysis indicated that

deberse al genotipo de la planta, que en ocasiones presenta maduración ineficaz durante el proceso morfogénico. Por ejemplo, los embriones somáticos de orquídeas (semillas sintéticas) en diferentes etapas germinaron (91 %) en MS con BAP y kinetina a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cada uno (Manokari et al., 2020). A pesar de que los embriones somáticos han sido inducidos en muchas especies, aún quedan problemas por resolver en el caso de *E. parryi*.

Histología

El examen histológico de las muestras de callo embriogénico mostró las estructuras globulares de los explantes de las semillas (Figura 4). En la Figura 4a se muestran las células meristemáticas organizadas para

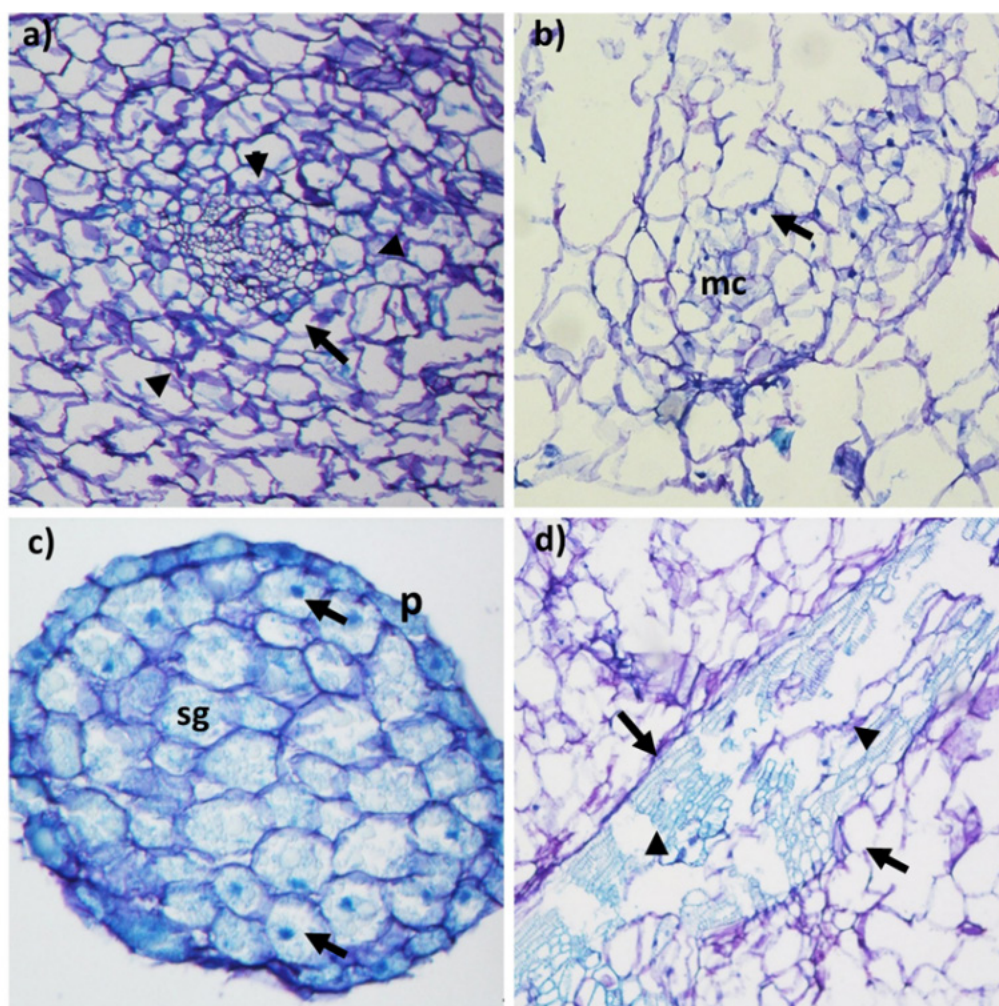


Figure 4. Histological analysis of the globular structures of embryogenic callus from seeds of *Echinocactus parryi* in $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D treatments. a) subepidermal globular embryo (arrow). b) meristematic cells (mc) with an intensely stained nucleus (arrow). c) isolated globular embryo with protoderm cells (p), meristematic cells with nuclei (arrow), and starch grains (sg) inside the cells. d) tracheid cells (arrowheads) and vascular tissue (arrows). The bars represent $200 \mu\text{m}$ (10X).

Figura 4. Análisis histológico de estructuras globulares de callo embriogénico a partir de semillas de *Echinocactus parryi* en tratamientos con $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2, 4-D. a) Embrión globular subepidérmico (flecha). b) Células meristemáticas (mc) con núcleo intensamente teñido (flecha). c) Embrión globular aislado con células de protodermo (p), células meristemáticas con núcleo (flecha) y granos de almidón (sg) en el interior de las células. d) Células traqueidas (puntas de flechas) y tejido vascular (flechas). Las barras representan $200 \mu\text{m}$ (10X).

from a series of organized cell divisions, the formation of somatic embryos was possible. Figure 5a shows a pro-embryo that develops from sub-epidermal cells with a well-stained nucleus and vacuolated cells with an evident protoderm. The initiation of a vascular system was observed in the torpedo-shaped embryo with the procambium cells and vascular tissue from the explant (Figure 5b). The typical vascular system in embryo formation and the lack of connection between the embryos and the explant tissue is confirmed through histological analysis of *O. ficus-indica* (Linhares et al. 2006). In Figure 5c, a torpedo shape

formar un embrión globular. Las células muestran núcleos intensamente teñidos y paredes celulares gruesas. Las células meristemáticas son pluripotentes y son el origen de los embriones somáticos (Hui-Ju, Jen-Tsung, Hsiao-Hang, & Wei-Chin, 2018). En la Figura 4b se observan células meristemáticas con un núcleo sólido teñido que dan lugar a la formación de embriones globulares. El protodermo se observó en un embrión globular aislado. Las células meristemáticas muestran un núcleo teñido, un citoplasma denso y granos de almidón (Figura 4c). El análisis histológico mostró células traqueidas en tejido vascular rodeadas

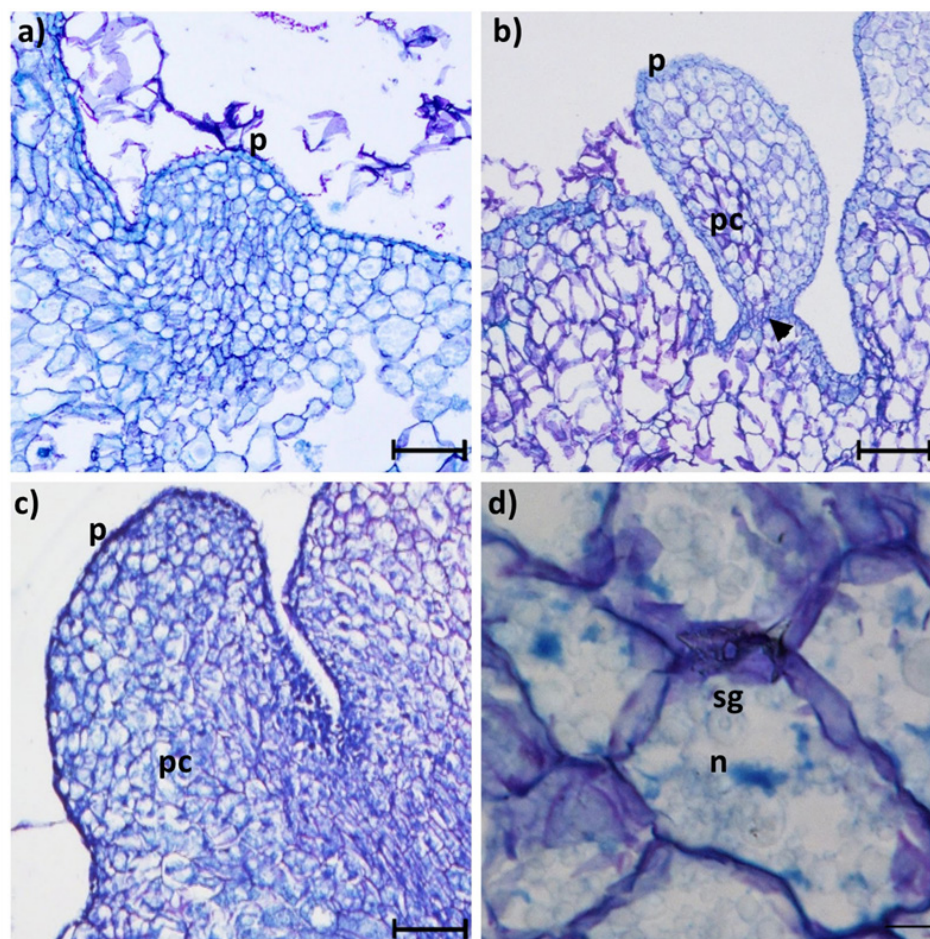


Figure 5. Longitudinal-sections of somatic embryos from compact green callus of *Echinocactus parryi* in $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kinetin treatment. a) somatic pro-embryo emerging from the subepidermal region with meristematic cells and protoderm (p) (10X, bar $200 \mu\text{m}$). b) somatic embryo in the torpedo stage with protoderm (p), procambium cells (pc), and vascular cells from the explant (arrow) (10X, bar $200 \mu\text{m}$). c) somatic embryo with protoderm (p) and procambium cells (pc) (10X, bar $200 \mu\text{m}$). d) meristematic cells of somatic embryos with starch grains (sg) and nucleus (n) (100X, bar $10 \mu\text{m}$).

Figura 5. Secciones longitudinales de embriones somáticos a partir de callos verdes compactos de *Echinocactus parryi* en tratamiento con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kinetina. a) Proembrión somático emergiendo de la región subepidérmica con células meristemáticas y protodermo (p) (10X, barra $200 \mu\text{m}$). b) Embrión somático en la fase de torpedo con protodermo (p) y células de procambium (pc) y células vasculares del explante (flecha) (10X, barra $200 \mu\text{m}$). c) Embrión somático con protodermo (p), células de procambium (pc) (10X, barra $200 \mu\text{m}$). d) Células meristemáticas de embriones somáticos con granos de almidón (sg) y núcleo (n) (100X, barra $10 \mu\text{m}$).

embryo is represented with an evident protoderm and procambium cells to initiate a vascular system. The procambium cells are a type of stem cell and can give a place to the formation of somatic embryos with a specific signal (Cunha et al., 2018; Rose, 2019). Figure 5d is a close sight of the cells from somatic embryos with a stained nucleus and numerous starch grains. Starch is a source of energy for cells that helps them in differentiation and cell division processes. It is also necessary for morphogenesis and differentiation of somatic embryos (Baskaran et al., 2016). The histological analysis is helpful to confirm the structural organization of the somatic embryos. The histological observations also showed the globular, heart-shaped,

de células vacuoladas (Figura 4d). En *O. ficus-indica*, Pinheiro et al. (2001) reportaron una estructura traqueidal desorganizada observada en *E. parryi*, lo que probablemente significa un desorden en el metabolismo endógeno y en la distribución de auxina dentro de las células que afectan la maduración de los embriones somáticos.

En la Figura 5 se representa el análisis histológico en sección longitudinal de los embriones somáticos generados a partir de callos verdes compactos. Este análisis indicó que la formación de embriones somáticos fue posible a partir de una serie de divisiones celulares organizadas. En la Figura 5a se muestra un proembrión

torpedo-shaped, and cotyledon stages.

Conclusions

This study showed that *Echinocactus parryi* can produce a high number of embryogenic structures, which represents a great potential to grow massive plants. The seeds and seedlings explants induced globular embryos via callus, but they could not reach the last stages of somatic embryogenesis. However, the non-embryogenic calli induced shoot formation. On the other hand, with the explant of the green compact callus, it was possible to obtain mature somatic embryos in the torpedo and cotyledonal stage, but not its germination. Based on the explants analyzed, it could be determined that *E. parryi* is an embryogenic species that goes through all the stages (globular, heart, torpedo and cotyledon) of somatic embryos; however, further studies are required to explain why the last stages were not able to reach plant regeneration. Also, it would be interesting to analyze the effect of other plant growth regulators and different sucrose concentrations for somatic embryo maturation.

Acknowledgments

The authors thank to CONACYT for the scholarship granted to Dolores Adilene García-González for carrying out this study.

End of English version

References / Referencias

- Al-Dein, E., Al-Ramamneh, E., Sriskandarajah S., & Serek, M. (2006). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 333–342. doi: 10.1007/s11240-005-9042-6
- Alvez, B., & Oropeza, M. (2015). Efecto de dicamba y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis somática en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 85–94. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54280
- Anzidei, A., Bennici, A., Schiff, C. T., & Mori, B. (2000). Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 69–79. doi: 10.1023/A:1006454702620
- Asad, M., Ahmed, N., Sohail, A., Sher, J., Tanveer, B., Hadi, F., ... Din, S. (2019). *In vitro* callus induction and plantlet regeneration of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Pure and Applied Biology*, 8(2), 1307–1313. doi: 10.19045/bspab.2019.80073
- Baskaran, P., Kumari, A., Naidoo, D., & Van Staden, J. (2016). *In vitro* propagation and ultrastructural studies of somatic embryogenesis of *Ledebouria ovatifolia*. *In Vitro Cellular and*

desarrollado a partir de células subepidérmicas con un núcleo bien teñido y células vacuoladas con un protodermo evidente. El inicio de un sistema vascular se observó en el embrión en forma de torpedo con células del procambium y tejido vascular del explante (Figura 5b). El sistema vascular típico en la formación del embrión, y la falta de conexión entre los embriones y el tejido del explante se ha confirmado mediante el análisis histológico de *O. ficus-indica* (Linhares et al. 2006). En la Figura 5c se representa un embrión en forma de torpedo con protodermo evidente y células de procambium para iniciar un sistema vascular. Las células del procambium son un tipo de célula madre y pueden dar lugar a la formación de embriones somáticos con una señal específica (Cunha et al., 2018; Rose, 2019). La Figura 5d es una vista cercana de las células de embriones somáticos con núcleo teñido y numerosos granos de almidón. El almidón es una fuente de energía para las células en los procesos de diferenciación y división celular, también es necesario para la morfogénesis y la diferenciación de embriones somáticos (Baskaran et al., 2016). El análisis histológico es útil para confirmar la organización estructural de embriones somáticos. Las observaciones histológicas también mostraron la fase globular, corazón, torpedo y cotiledón.

Conclusiones

El estudio demostró que *Echinocactus parryi* puede producir un número elevado de estructuras embriogénicas, lo que representa un gran potencial para el cultivo masivo de plantas. Los explantes de semillas y plántulas indujeron embriones globulares mediante callo, pero no pudieron alcanzar las últimas etapas de embriogénesis somática; sin embargo, los callos no embriogénicos indujeron la formación de brotes. Por otra parte, con el explante del callo verde compacto se pudieron obtener embriones somáticos maduros en la fase de torpedo y cotiledón, pero no su germinación. Con base en los explantes analizados se pudo determinar que *E. parryi* es una especie embriogénica que pasa por todas las fases (globular, corazón, torpedo y cotiledón) de embriones somáticos; no obstante, se requieren más estudios para explicar por qué las últimas fases no alcanzaron la regeneración de la planta. Asimismo, sería interesante analizar el efecto de otros reguladores de crecimiento vegetal y de diferentes concentraciones de sacarosa para la maduración de embriones somáticos.

Agradecimientos

Agradecemos al CONACYT por la beca otorgada a Dolores Adilene García-González para la realización de este estudio.

Fin de la versión en español

- Developmental Biology - Plant*, 52, 283–292. doi: 10.1007/s11627-016-9762-9
- Baskaran, P., & Van Staden, J. (2017). Ultrastructure of somatic embryo development and plant propagation for *Lachenalia montana*. *South African Journal of Botany*, 109, 269–274. doi: 10.1016/j.sajb.2017.01.006
- Bednarek, P. T., & Orlowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140(2), 245–257. doi: 10.1007/s11240-019-01724-1
- Bouamama, B., Ben, A., Zoghalmi, N., Zemni, H., Mliki, A., & Ghorbel, A. (2011). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature anthers of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 86(4), 313–318. doi: 10.1080/14620316.2011.11512766
- Brand A., Quimbaya, M., Tohme, J., & Chavarriaga-Aguirre, P. (2019). *Arabidopsis* LEC1 and LEC2 orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–14. doi: 10.3389/fpls.2019.00673
- Correia, S., Cunha, A. E., Salgueiro, L., & Canhoto, J. M. (2012). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 109, 143–152. doi: 10.1007/s11240-011-0082-9
- Cunha, B. P. M., Teixeira, G. H., Gomes, S. M., Vasconcelos, F. S. C., Batista, T. J., & Schjerwinski-Pereira, J. E. (2018). Histology of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Biologia*, 73, 1255–1265. doi: 10.2478/s11756-018-0131-5
- Debbrema, R., Sudhakar, D., Kumar, K., & Soorianathasundaram, K. (2019). Morphological and ultrastructure of developmental stages of somatic embryos of popular banana cultivars. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 1676–1683. doi: 10.20546/ijcmas.2019.806.200
- Garcia, C., Furtado, A. A. A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S., & Mrelli, J. P. (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137, 193–212. doi: 10.1007/s11240-019-01569-8
- García-González, D. A., Santos-Díaz, M. del S., Flores-Margez, J. P., & Osuna-Avila, P. (2020). Influencia del Ca²⁺, pH, agar y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Echinocactus parryi* (Engelm). *Terra Latinoamericana*, 38(3), 489–498. doi: 10.28940/terra.v38i3.734
- Hui-Ju, S., Jen-Tsung, C., Hsiao-Hang, C., & Wei-Chin, C. (2018). Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Tournefortia Louise* elmore 'Elsa'. *Botanical Studies*, 59(4), 1–7. doi: 10.1186/s40529-018-0220-3
- IBM Corp. (2017). IBM SPSS statistics for windows, version 25.0. Armonk, NY: Author.
- Infante, R. (1992). *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocractus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 155–159. doi: 10.1007/BF00037700
- Jhong, K. S., Pintado, C. R., & Jiménez, D. J. (2019). Inducción de embriogenesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259–264. doi: 10.17268/sci.agropecu.2019.02.11
- Kaaniche-Elloumi, N., Jeddi, E., Mahmoud, K. B., Chakroun, A., & Jemmali, A. (2015). Gibberelic acid application and its incidence on *in vitro* somatic embryogenesis and fruit parthenocarp in an apomictic cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) clone. *Acta Horticulturae*, 1067, 225–230. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1067.31
- Lema-Ruminska, J. (2011). Flow cytometric analysis of somatic embryos, shoots and calli of the cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma monstrosa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106, 531–535. doi: 10.1007/s11240-011-9941-7
- Lema-Rumińska, J., Goncerzewicz, K., & Gabriel, M. (2013). Influence of abscisic acid and sucrose on somatic embryogenesis in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma monstrosa. *The Scientific World Journal*, Article ID 513985. doi: 10.1155/2013/513985
- Lincy, A. K., Remashree, A. B., & Sasikumar, B. (2009). Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Botanica Croatica*, 68(1), 93–103. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/27219463_Indirect_and_direct_somatic_embryogenesis_from_aerial_stem_explants_of_ginger_Zingiber_officinale_Rosc
- Linhares, F., Ferreira, A., Fernandes, F., Barbeta, P., Facó, O., & Paiva, F. A. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, 108(1), 15–21. doi: 10.1016/j.scienta.2005.12.007
- Moebius-Goldammer, K. G., Mata-Rosas, M., & Chávez-Avila, V. M. (2003). Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 388–393. doi: 10.1079/IVP2003427
- Manokari, M., Latha, R., Priyadarshini, S., Jogam, P., & Shekhawat, A. S. (2020). Short-term cold storage of encapsulated somatic embryos and retrieval of plantlets in grey orchid (*Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex G. Don). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44, 171–183. doi: 10.1007/s11240-020-01899-y
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nugent, G., Chandler, S. F., Whiteman, P., & Stevenson, T. W. (2001). Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 85–88. doi: 10.1023/A:1011691110515
- Osuna, P., & Barrow, J. R. (2004). Regeneration of black grama (*Bouteloua eriopoda* Torr. Torr.) plants via somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40, 299–302. doi: 10.1079/IVP2003533
- Pedda, K. D., Sai, K. N., Suneetha, P., Bramareswara, R. K.,

- Naresh, K. M., & Krishna, M. S. R. (2019). Multiple shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of red dragon fruit (*Hylocereus costaricensis*). *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(4), 1491–1494. doi: 10.5958/0974-360X.2019.00246.4
- Pinheiro, S., Soares, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2001). Studies on the induction of embryogenic globular structures in *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 4, 66–74. Retrieved from <https://jpacd.org/jpacd/article/view/136>
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285–301. doi: 10.1007/s11240-006-9139-6
- Quiñónez, M. M., Enríquez, A. I. D., Flores, M. J. P., Palacios, R. K., Olivares, S. M., Garza, O. F., ... Nájera, M. J. (2018). Comunidades vegetales en suelo de ecosistema semiárido y su relación con hongos micorrízicos. *Terra Latinoamericana*, 36(4), 381–391. doi: 10.28940/terra.v36i4.401
- Rose, J. R. (2019). Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–14. doi: 10.3389/fpls.2019.00267
- Rugkhla, A., & Jones, M. G. K. (1998). Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum*. *Journal of Experimental Botany*, 49(320), 563–571. doi: 10.1093/jxb/49.320.563
- Salma, U., Kundu, S., Ali, M. N., & Mandal, N. (2019). Somatic embryogenesis-mediated plant regeneration of *Eclipta alba* (L.) Hask. and its conservation through synthetic seed technology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, Article 103. doi: 10.1007/s11738-019-2898-6
- Santos-Díaz, M. S., Pérez-Molphe, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011). Mexican threatened cacti: Current status and strategies for their conservation. *Species Diversity and Extinction*, 59(1), 1–60. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/285997331_Mexican_threatened_cacti_Current_status_and_strategies_for_their_conservation
- Saptari, R. T., & Susila, H. (2019). Data mining study of hormone biosynthesis gene expression reveals new aspects of somatic embryogenesis regulation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55, 139–152. doi: 10.1007/s11627-018-9947-5
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México: Diario Oficial de la Federación. Retrieved from http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/03/2020
- Silveira, V., De Vita, A. M., Macedo, A. F., Ribeiro, M. F., Segal, E. I., & Santa-Catarina, C. (2013). Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, 351–364. doi: 10.1007/s11240-013-0330-2
- Stuppy, W., & Nagl, W. (1992). Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*, 10, 85–88. doi: 10.25223/brad.n10.1992.a7
- Torres-Silva, G., Resende, S. V., Lima-Brito, A., Bezerra, H. B., de Santana, J. R. F., & Schnadelbach, A. S. (2018). *In vitro* shoot production, morphological alterations and genetic instability of *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), an endangered species endemic to eastern Brazil. *Sotuh African Journal of Botany*, 115, 100–107. doi: 10.1016/j.sajb.2018.01.001
- Villanueva, R. M. (2016). Germinación de tres especies de cactáceas endémicas de México en condiciones asépticas. *Zonas Áridas*, 16(1), 1–16. doi: 10.21704/za.v16i1.633
- Vondráková, Z., Eliášová, K., Fischerová, L., & Vágner, M. (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 61(4), 587–596. doi: 10.2478/s11535-011-0035-7
- Wakhlou, A. K., & Bhau, B. S. (2000). Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36, 211–214. doi: 10.1007/s11627-000-0039-x
- Wu, G. Y., Wei, X. L., Wang, X., & Wei, Y. (2020). Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142, 229–240. doi: 10.1007/s11240-020-01822-5
- Yang, K., Wang, L., Le, J., & Dong, J. (2020). Cell polarity: Regulators and mechanisms in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 132–147. doi: 10.1111/jipb.12904