

6-BENZYLAMINOPURINE AND 2, 4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID EFFECT ON CALLUS GENESIS OF *Brosimum alicastrum*

EFFECTO DE 6-BENCILAMINOPURINA Y ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA CALLOGÉNESIS DE *Brosimum alicastrum*

Angel Virgilio **Domínguez-May**^{1*}, José Augusto **Nah-Hau**¹, Israel **García-Sheseña**², Sara Luz **Nahuat-Dzib**³, José Luis **Giorgana-Figueroa**³, Estefanía **Escalante-Zapata**⁴, José Efraín **Ramírez-Benítez**⁴, Ana Paula **Gamba-Galeazzis**⁵

¹Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. Carretera Muna-Felipe Carrillo Puerto. Tramo Oxkutzcab-Akil. Km 41+400. 97880. Oxkutzcab, Yucatán, México. (virgiliomay@hotmail.com). ²Parque Científico Tecnológico de Yucatán A.C. Km 5.5. Carretera Sierra Papacal-Chuburná. 97302. Sierra Papacal, Yucatán, México. ³Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Mérida. Km 5. Carretera Mérida-Progreso. 97118. Mérida, Yucatán, México. ⁴Facultad de Ciencias Químico Biológicas/ Universidad Autónoma de Campeche. Avenida Ingeniero Humberto Lanz Cárdenas S/N Colonia Ex-Hacienda Kalá. 24085. San Francisco de Campeche, Campeche, México. ⁵Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510.

ABSTRACT

Brosimum alicastrum seeds contain a high percentage of protein and essential amino acids that contribute to a proper nutrition. This tree is an alternative in the so-called crusade against hunger and its management does not involve the use of agrochemicals. The objective of this research was to evaluate the morphogenic response of foliar explants with two growth regulators, 6-Benzylaminopurine (BAP) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) in the induction of *calli*. Results demonstrated that the combination of 1.5 mg L⁻¹ BAP and 1 mg L⁻¹ 2,4-D (TM) and 1.5 mg L⁻¹ BAP with 2 mg L⁻¹ 2,4-D (TN) favored callus growth in 100% of foliar explants. *Calli* were grown in a period of 20 d, in a culture room at 25 ± 4 °C, with 16 h of illumination. Under these conditions, *calli* remained in slow growth for four weeks. Those explants that generated callus were sub-cultured in fresh medium without activated charcoal. In TM and TN treatments, the multiplication of the cell mass was favored; in TN globular structures were formed. However, explants the same treatments TM and TN with activated charcoal, and under ambient 29 ± 4 °C conditions increased callus growth, but became friable at two weeks. Thus, TM and TN were the better treatments, but activated charcoal was determined to have a negative effect on callus growth.

RESUMEN

Las semillas de *Brosimum alicastrum* contienen un porcentaje alto de proteínas y aminoácidos esenciales que contribuyen a una nutrición adecuada. Este árbol es una alternativa para la llamada cruzada contra el hambre y su manejo no implica el uso de agroquímicos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta morfogénica de los explantes foliares con dos reguladores de crecimiento: la 6-Bencilaminopurina (BAP) y el Ácido 2,4-Diclorofenoxyacético (2,4-D) en la inducción de callos. Los resultados demostraron que la combinación de 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D (TM) y 1.5 mg L⁻¹ de BAP con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D (TN) favorecieron el crecimiento de callos en el 100% de los explantes foliares. Los callos se dejaron crecer por un periodo de 20 d, en una sala de cultivo a 25 ± 4 °C, con 16 h de iluminación. En estas condiciones, los callos permanecieron en crecimiento lento durante cuatro semanas. Los explantes que generaron callo se subcultivaron en medio fresco sin carbón activado. Los tratamientos TM y TN favorecieron la multiplicación de la masa celular; con TN se formaron estructuras globulares. Sin embargo, los mismos tratamientos TM y TN con carbón activado y en condiciones ambientales 29 ± 4 °C, incrementaron el crecimiento de callos, pero se volvieron friables a las dos semanas. Por lo tanto TM y TN fueron los tratamientos mejores, pero se determinó que el carbón activado tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de callo.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.
Received: April, 2020. Approved: December, 2020.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 55: 133-144. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i2.2391>

Palabra clave: ramón, reguladores de crecimiento, BAP, 2,4-D, *Brosimum alicastrum*, callogénesis.

Key words: breadnut, growth regulators, BAP, 2,4-D, *Brosimum alicastrum*, callus genesis.

INTRODUCTION

The Breadnut (*Brosimum alicastrum*) is a tropical tree distributed in the tropical and subtropical forests of Mexico and Central America. Scientific name comes from the Greek *Brosimos*, which means “edible.” In Mexico and Belize, it is known as breadnut or *oox* in the Mayan language (Meiners *et al.*, 2009), and individual trees may be male or female. This tree can produce fruit up to 56 Mg ha⁻¹; therefore, it would help the so-called crusade against hunger. This tree does not cause soil erosion, and its management does not involve the use of agrochemicals (Hernández-González *et al.*, 2015). It can also be used for the preparation of products for human and livestock consumption (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2017), because of its high protein and other nutrients.

Breadnut is important for research about its benefits; it may be an alternative against excessive consumption of corn (*Zea mays*) in Mexico. Since 2011, our research group has published about the relevance of incorporating this tree to the governmentally called crusade against hunger (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2017). The Academy of Sciences of The United States considered breadnut tree as one of the underexploited species with promising economic value (La Jornada, 2013). The genetic variability of sexual reproduction in this species is the reason why there are no commercial plantations yet.

Plant biotechnology strategies would lead to establish clones with desirable characteristics and able to produce plenty of biological material from this tree. Besides, it is considered as a recalcitrant timber species, with a high added value (Peña-Ramírez *et al.*, 2011). The process of somatic embryogenesis is an alternative for the clonal propagation of elite individuals to be phenotypically identical or simply germplasm to preserve the genetic material of the species (Cardoso *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2016).

Plant tissue culture is based on the induction of the morphogenic response of a plant explant using growth regulators contained in a basal culture medium. The observed morphogenic response is a function of the composition of the basal medium,

INTRODUCCIÓN

El ramón (*Brosimum alicastrum*) es un árbol distribuido en los bosques tropicales húmedos y semihúmedos de México y Centroamérica. El nombre científico proviene del griego *brosimos*, que significa “comestible.” En algunos lugares de México y Belice, se le conoce como *oox* en lengua Maya, es decir, árbol de pan (Meiners *et al.*, 2009). Los individuos de esta especie de árbol pueden ser masculinos o femeninos. Los femeninos pueden producir hasta 56 Mg ha⁻¹; de fruto. De modo que podría ser un aliado en la así llamada cruzada contra el hambre. Este árbol no causa erosión en el suelo y su manejo no involucra el uso de agroquímicos (Hernández-González *et al.*, 2015). También puede utilizarse para preparar productos para consumo humano y del ganado (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2017), por sus contenidos de proteína altos y otros nutrientes.

B. alicastrum es importante para la investigación debido a sus beneficios; puede ser una alternativa al consumo excesivo de maíz (*Zea mays*) en México. Desde 2011, nuestro grupo de investigación ha publicado sobre la relevancia de incorporar este árbol a la cruzada gubernamental contra el hambre (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2017). La Academia de Ciencias de Estados Unidos consideró al ramón como una de las especies subexplotadas con un valor económico prometedor (La Jornada, 2013). La variabilidad genética en la reproducción dioica de esta especie es la razón por la cual aún no existen plantaciones comerciales.

Las estrategias basadas en biotecnología vegetal permitirían establecer clones con características deseables y capaces de producir suficiente material biológico de este árbol. Además, se considera una especie maderable recalcitrante, con un valor alto añadido (Peña-Ramírez *et al.*, 2011). El proceso de embriogénesis somática se ha convertido en una alternativa para la propagación clonal de individuos élite para que sean fenotípicamente idénticos o simplemente germoplasma para preservar el material genético de la especie (Cardoso *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2016).

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la inducción de la respuesta morfogénica de un explante vegetal mediante reguladores del crecimiento contenidos en un medio de cultivo basal. La respuesta morfogénica observada, de acuerdo con Phillips y Garda (2019) es función de la composición del medio basal,

concentration of phytohormones and culture conditions, as well as the study model and type of explant, according to Phillips and Garda (2019).

Auxins and cytokinins are the most widely used growth regulators, with a preference for the use of synthetic compounds due to their greater stability and morphogenic power compared to those of natural origin (Herman, 2015). The most commonly used auxins are α -naphthalene-acetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-acetic acid (IAA), and Picloram. While the most frequently used cytokines are 6-benzylaminopurine and kinetin (Herman, 2015). Other growth regulators to consider are gibberellins, anti-gibberellins, ethylene blockers, abscisic acid, and brassino-steroids. Many morphogenic responses ranging from callus genesis to somatic embryogenesis and shoot induction were observed in *Trifolium pratense* L. (red clover), because of altering the balance of growth regulators in the induction medium (Phillips and Collins, 1984).

It is a priority for any future Breadnut germplasm conservation, propagation, and improvement program, to establish the conditions for induction of the *in vitro* morphogenic response. In particular, the identification of those conditions that determine relative concentrations of growth regulators. Therefore, the objective of our study was to evaluate the response of leaf explants of *Brosimum alicastrum* in callus genesis in the presence of different concentrations and combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaf explants of *B. alicastrum* were collected on September from a 5-years-old tree specimen found at Parque Científico y Tecnológico de Yucatán A.C., a unit of the CICY Germplasm Bank, Mexico.

Decontamination process

Decontamination process began with trimming leaves from collected branches of *B. alicastrum*, the younger leaves were selected and placed in water with liquid detergent. Leaves were washed with a sponge, very carefully to avoid any damage, and they were deposited in a beaker containing citric acid solution (100 mg L⁻¹). Decontamination process continued in the laminar

la concentración de fitohormonas y las condiciones de cultivo, así como del modelo de estudio y el tipo de explante.

Las auxinas y citoquininas son los reguladores de crecimiento más utilizados, y se prefiere el uso de compuestos sintéticos por su mayor estabilidad y poder morfogénico en comparación con los de origen natural (Herman, 2015). Las auxinas más utilizadas son el ácido α -naftaleno-acético (NAA), el ácido indol-3-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol-3-acético (IAA) y el Picloram. Mientras que las citoquininas más utilizadas son la 6-benzilaminopurina y la kinetina (Herman, 2015). Otros reguladores del crecimiento que se consideran son las giberelinas, las anti giberelinas, los bloqueadores del etileno, el ácido abscísico y los brasinoesteroides. Muchas respuestas morfogénicas, las cuales van de la callogénesis a la embriogénesis somática e inducción de brotes aéreos se observaron en el trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), debido a alteraciones en el balance de los reguladores de crecimiento en el medio para inducción (Phillips and Collins, 1984).

Para cualquier programa futuro de conservación, propagación y mejora del germoplasma de ramón es prioritario establecer las condiciones para la inducción de la respuesta morfogénica *in vitro*. En especial, la identificación de aquellas que determinan las concentraciones relativas de los reguladores de crecimiento. Por lo tanto, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar la respuesta de los explantes foliares de *Brosimum alicastrum* para callogénesis en presencia de concentraciones y combinaciones diferentes de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los explantes foliares de *B. alicastrum* se colectaron en septiembre de un ejemplar arbóreo de 5 años que se encuentra en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán A.C., unidad del Banco de Germoplasma del CICY, México.

Proceso de descontaminación

Para el proceso de descontaminación se recortaron las hojas de las ramas colectadas de *B. alicastrum*, se seleccionaron las hojas más jóvenes y se colocaron en agua con detergente líquido. Con

flow hood. Leaves were taken with sterile pliers, and placed in a 250 mL flask with distilled water, Captan fungicide 50 (3 g L^{-1}) plus Tween 20 were added, and the beaker was shaken for 60 min. The solution was removed from the flask, and leaves were rinsed twice with distilled water, each rinse for 1 min.

Subsequently, leaves were immersed in a PPM antibiotic solution (1.5 mL L^{-1}) for 40 min. Afterwards the solution of the flask was removed and rinsed with sterile distilled water for 1 min. Next, leaves were maintained in 70% ethanol for 2 min. Then, alcohol was removed and leaves rinsed with distilled water. To finish decontamination process, leaves were immersed 30 min in a solution of 30% sodium hypochlorite, and three rinses were made with distilled water for 1 min each. At the end, each leaf was cut top and bottom, and explants were obtained, size around 1.5 cm^2 (Figure 1E).

una esponja se lavaron con mucho cuidado para evitar cualquier daño y se depositaron en un vaso de precipitados que contenía una solución de ácido cítrico (100 mg L^{-1}). El proceso de descontaminación continuó en la campana de flujo laminar. Con pinzas estériles se tomaron las hojas y se colocaron en un matraz de 250 mL con agua destilada, se añadió el fungicida Captan 50 (3 g L^{-1}) más Tween 20 y se agitó durante 60 min. La solución se retiró del matraz y las hojas se enjuagaron dos veces con agua destilada; cada enjuague durante 1 min.

A continuación, las hojas se sumergieron en una solución de antibiótico PPM (1.5 mL L^{-1}) durante 40 min. Después, se retiró la solución del frasco y se enjuagó con agua destilada estéril durante 1 min. A continuación, las hojas se mantuvieron en alcohol etanol al 70% durante 2 min. Luego, se retiró el etanol y las hojas se enjuagaron con agua destilada. Para finalizar el

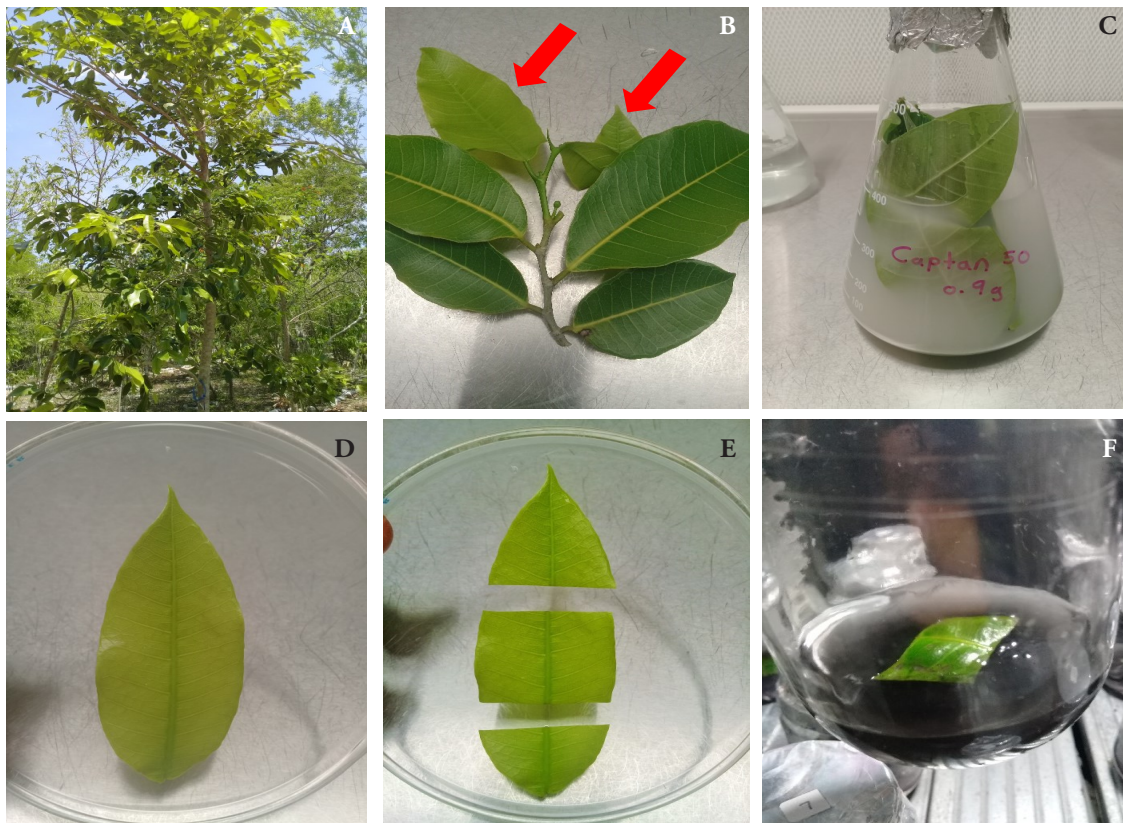


Figure 1. Decontamination method of *B. alicastrum* leaf explants. A) *B. alicastrum* tree. B) Selection of young leaves (red arrows). C) Leaves dipped in biocide solution. D) Leaf previously decontaminated. E) Segmented leaf. F) Leaves in treatments enriched with activated carbon.

Figura 1. Método de descontaminación de explantes de hojas de *B. alicastrum*. A) Árbol de *B. alicastrum*. B) Selección de hojas jóvenes (flechas rojas). C) Hojas sumergidas en solución biocida. D) Hoja previamente descontaminada. E) Hoja segmentada. F) Hojas en tratamientos adicionados con carbón activado.

Treatments for inducing callus genesis

Murashige and Skoog base medium was used to evaluate the callus genesis (Murashige and Skoog, 1962) with 20 treatments, each one with 10 mL L⁻¹ of Gamborg vitamin (Gamborg *et al.*, 1968), at 20 X, 2.2 g L⁻¹ of Gelrite, 30 g L⁻¹ sucrose, 3 g L⁻¹ activated charcoal, 300 mg L⁻¹ polyvinyl pyrrolidone (PVP) and 1.5 mL L⁻¹ Plant Preservative Mixture (PPM, Plant Cell Technology™ Cat N° 100-PPM). Nineteen of the treatments were supplemented with different concentrations and combinations of BAP and 2,4-D, and one treatment did not include growth regulators (Table 1). The pH of the medium was between 5.7-5.8 and sterilized 20 min at 121 °C and a pressure of 0.1177 MPa.

Culture of leaf explants

Two leaf explants were placed on MS medium (Murashige and Skoog, 1962), each of the 20 treatments with activated charcoal. Explants were kept in a culture room at 25 ± 4 °C.

Sub-culture of explants

On day 30, explants were sub-cultured in fresh medium without activated charcoal, same chemical and ambient temperature conditions (29 ± 4 °C) were maintained in the laboratory with a natural photoperiod of 16 h light with an average brightness of 59 Lumens m⁻².

Statistical analysis

In order to measure the parameters in the callus induction, a two-factor experiment with two replicates was carried out twice. There were 20 treatments with different combinations of 2,4-D and BAP concentrations. Data analysis was performed using SPSS (IBM) version 19.

RESULTS AND DISCUSSION

Decontamination process of leaf explants with chlorine

With the decontamination method, more than 80% of leaf explants were obtained without damage by chlorine (Table 2). Therefore, this method is acceptable, and it can be recommended for the removal of microorganisms in the *B. alicastrum* leaves. If the purpose is to adapt to *in vitro* conditions, a schematic method of the decontamination is shown below (Figure 1).

Table 1. Codes for culture treatments of combined growth regulator concentrations used to evaluate callus genesis in leaf explants.

Cuadro 1. Códigos de tratamientos de cultivo por combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados para evaluar callogénesis en explantes foliares.

		2,4-D					
		mg L ⁻¹	0	0.5	1	2	3
BAP	0	TA	TB	TC	TD	TE	
	1	TF	TG	TH	TI	TJ	
	1.5	TK	TL	TM	TN	TÑ	
	2	TO	TP	TQ	TR	TS	

proceso de descontaminación, las hojas se sumergieron 30 min en una solución de hipoclorito de sodio al 30%, y se realizaron tres enjuagues con agua destilada durante 1 min cada uno. Al final, cada hoja se cortó por la parte superior e inferior, y se obtuvieron explantes de aproximadamente 1.5 cm² (Figura 1E).

Tratamientos para la inducción de callogénesis

El medio base de Murashige y Skoog se utilizó para evaluar la callogénesis (Murashige y Skoog, 1962) con 20 tratamientos, cada uno con 10 mL L⁻¹ de vitaminas de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968), a 20 X, 2.2 g L⁻¹ de Gelrite, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de carbón activado, 300 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) y 1.5 mL L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPM, Plant Cell Technology™ Cat N° 100-PPM). Diecinueve de los tratamientos se suplementaron con diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y 2,4-D, y un tratamiento no tuvo reguladores de crecimiento (Cuadro 1). El pH del medio estuvo entre 5.7-5.8 y se esterilizó 20 min a 121 °C y presión de 0.1177 MPa.

Cultivo de explantes foliares

Dos explantes foliares se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), y a los 20 tratamientos se les adicionó carbón activado. Los explantes se mantuvieron en un cuarto de cultivo a 25 ± 4 °C.

Subcultivo de explantes

En el día 30, los explantes se subcultivaron en medio fresco sin carbón activado, se mantuvieron las mismas condiciones químicas y a temperatura ambiente (29 ± 4 °C) en el laboratorio, y un fotoperiodo natural de 16 h de luz con una luminosidad media de 59 Lúmenes m⁻².

Table 2. Percentage leaf explants decontaminated in the decontamination process by chlorine.
Cuadro 2. Porcentaje de explantes de hoja descontaminados con la aplicación de hipoclorito de sodio.

Replicate	Number of leaf explants	Number of leaf explants damaged	Number of leaf healthy explants	Healthy explants (%)
1	80	10	70	87.5
2	80	13	67	83.8
3	80	8	72	90.0

Callus formation from leaf explants

The induction of the callus genesis process was dependent on the combination of specific concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) because it was shown that callus formation does not occur at any concentration of both growth regulators (Table 3).

Análisis estadístico

Para medir los parámetros en la inducción de callo se realizó por duplicado un experimento de dos factores con dos repeticiones; hubo 20 tratamientos con combinaciones de concentraciones diferentes de 2,4-D y BAP. El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS (IBM) versión 19.

Table 3. Induction of callus genesis from *Brosimum alicastrum* leaf explants cultured under different growth regulator combinations. No. of explants per treatment = 2.

Cuadro 3. Inducción de la callogénesis a partir de explantes foliares de *Brosimum alicastrum* cultivados bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. Número de explantes por tratamiento = 2.

Treatment	BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	No. of explants with callus genesis		Callus formation (%)
			Replicate 1	Replicate 2	
TA	0	0	0	0	0
TB	0	0.5	0	0	0
TC	0	1	0	0	0
TD	0	2	0	0	0
TE	0	3	0	0	0
TF	1	0	0	0	0
TG	1	0.5	0	0	0
TH	1	1	0	0	0
TI	1	2	0	0	0
TJ	1	3	0	0	0
TK	1.5	0	0	0	0
TL	1.5	0.5	0	0	0
TM	1.5	1	2	2	100
TN	1.5	2	2	2	100
TÑ	1.5	3	0	0	0
TO	2	0	0	0	0
TP	2	0.5	0	0	0
TQ	2	1	0	0	0
TR	2	2	0	0	0
TS	2	3	0	0	0

The formation of callus was favored by treatment TM with 1.5 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ of 2,4-D, and treatment TN with 1.5 mg L⁻¹ of BAP and 2 mg L⁻¹ of 2,4-D (Figure 2).

Statistical analysis (ANOVA) showed that the growth regulators, BAP and 2,4-D (Table 4), have a significant influence on the response of callus induction in foliar explants of *B. alicastrum*, which it was confirmed because there was no callus formation in the absence of growth regulators (Figure 2).

Different concentrations of 2,4-D with 1 mg L⁻¹ BAP did not express callus formation, and the combination of 2 mgL⁻¹ of BAP and 2,4-D showed low callus formation. However, 1.5 mg L⁻¹ of BAP promoted callus formation, which had its greatest effects in the TN and TM treatments (Table 5 and Table 6).

The callus induction response in foliar explants of *B. alicastrum* presented differences with those observed by Riaz *et al.* (2016), that concentrations

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de descontaminación de explantes

Con el método de descontaminación, más del 80% de los explantes de hoja se obtuvieron sin daños por el hipoclorito de sodio (Cuadro 2). Por lo tanto, este método es aceptable y puede recomendarse para la eliminación de microorganismos presentes en las hojas de *B. alicastrum*. Así, para el establecimiento en condiciones *in vitro*, se presenta un método esquemático de la descontaminación (Figura 1).

Formación de callo a partir de explantes foliares

La inducción del proceso de calogénesis dependió de la combinación de concentraciones específicas de 6-bencilaminopurina (BAP) y 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), ya que se demostró que la formación de callo no se produce con cualquier concentración

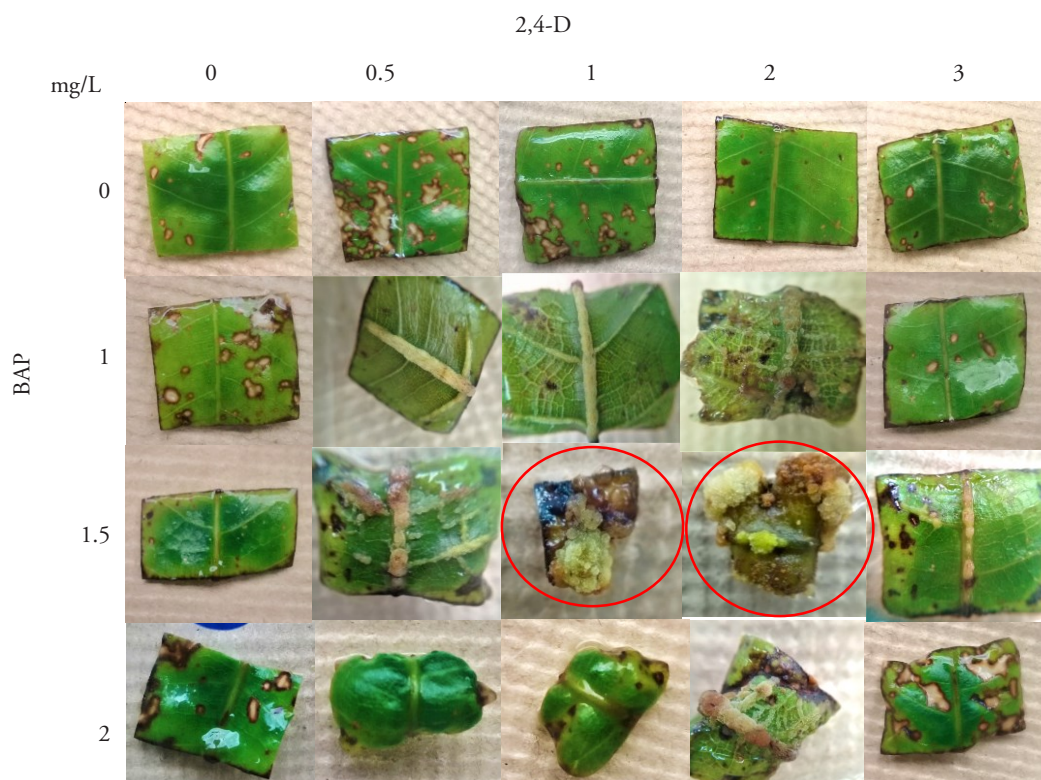


Figure 2. Callus formation of *Brosimum alicastrum* in the presence of BAP and 2,4-D. The explants marked with a red circle are those that formed calli in the presence of a particular combination of specific concentrations of BAP and 2,4-D.

Figura 2. Formación de callos de *Brosimum alicastrum* en presencia de BAP y 2,4-D. Los explantes marcados con un círculo rojo son los que formaron callos en presencia de concentraciones específicas de BAP y 2,4-D en combinación.

Table 4. Statistical analysis of the effect of BAP and 2,4-D in the calli induction.
Cuadro 4. Análisis estadístico del efecto del BAP y del 2,4-D en la inducción de callos.

ANOVA of BAP and D 2,4D regulators on <i>Brosimum alicastrum</i> leaves					
Dependent variable: Callus genesis					
Origin	Square sum Class III	df	Quadratic mean	F	significant
Corrected model	3.600 ^a	7	0.514	10.286	0.000
Intercept	0.800	1	0.800	16.000	0.000
BAP	2.400	3	0.800	16.000	0.000
2,4-D	1.200	4	0.300	6.000	0.000
Error	3.600	72	0.050		
Total	8.000	80			

Table 5. Effect analysis of BAP in the calli induction.
Cuadro 5. Análisis de BAP en la inducción de callos.

BAP effect			
BAP	N	Families	
		1	2
0.00	20	0.000	
1.00	20	0.000	
2.00	20	0.000	
1.50	20		0.400
significant		1.000	1.00

Tukey (DHS) $p \leq 0.05$; based on the harmonic mean of sampled size = 20. ♦ Tukey (DHS) $p \leq 0.05$; basado en la media armónica del tamaño de la muestra = 20.

Table 6. Effect analysis of 2,4-D in the calli induction.
Cuadro 6. Análisis de 2,4-D en la inducción de callos.

2,4-D effect			
2,4-D	N	Families	
		1	2
0.00	16	0.0000	
0.50	16	0.0000	
3.00	16	0.0000	
1.00	16		0.2500
2.00	16		0.2500
significant.		1.000	1.000

Tukey (DHS) $p \leq 0.05$; based on the harmonic mean of sampled size = 16. ♦ Tukey (DHS) $p \leq 0.05$; basado en la media armónica del tamaño de la muestra = 16.

de ambos reguladores del crecimiento (Cuadro 3). La formación de callo fue estimulada por el tratamiento TM con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; y el tratamiento TN con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 2 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 2).

El análisis estadístico (ANDEVA) mostró que los reguladores de crecimiento, BAP y 2,4-D (Cuadro 4), tienen una influencia significativa en la respuesta de la inducción de callo en los explantes foliares de *B. alicastrum*, lo cual se confirmó porque no hubo formación de callo en ausencia de reguladores de crecimiento (Figura 2).

Las diferentes concentraciones de 2,4-D con 1 mg L⁻¹ de BAP no expresaron la formación de callo y la combinación de 2 mg L⁻¹ de BAP y 2,4-D mostró una baja formación de callo. Sin embargo, 1.5 mg L⁻¹ de BAP promovió la formación de callo, que tuvo sus mayores efectos en los tratamientos TN y TM (Cuadro 5 y Cuadro 6).

La respuesta de inducción de callo en explantes foliares de *B. alicastrum* presentó diferencias con Riaz *et al.* (2016), quienes observaron que las concentraciones de 2,4-D y BAP promovieron la formación de callo en *Cucurbita moschata*. Este efecto también lo reportaron sobre *Piper betle* (Junairiah *et al.*, 2018). En ambos estudios se determinó que existe una relación entre las concentraciones de los reguladores BAP y 2,4-D con la respuesta temporal en la formación de callo. En *B. alicastrum*, los callos se formaron en unos 20 d y hubo un mayor crecimiento de callos en los tratamientos TN y TM. Esto sugiere que la respuesta morfológica generada por los reguladores 2,4-D y BAP depende de la especie vegetal.

of 2,4-D and BAP promoted callus formation in *Cucurbita moschata*. This effect was also reported on *Piper betle* (Junairiah *et al.*, 2018). In both studies, it was determined that there is a relationship between the concentrations of the regulators BAP and 2,4-D with the time response in callus formation. In *B. alicastrum*, the *calli* were formed in about 20 d and there was higher callus growth in the TN and TM treatments. This suggests that the morphogenic response generated by regulators 2,4-D and BAP depends on plant species.

There are studies of the *callusgenic* response of different plant species in which auxin and cytokinin growth regulators were applied in order to multiply individuals. Thus, Kumlay y Ercisli (2015) evaluated the effect of growth regulators on explants of *Solanum tuberosum* nodal segments and leaf tissue; they found the development of callus genesis in both explants with DM culture medium with 3 mg L⁻¹ of benzyl amino purine (BAP) + 2 mg L⁻¹ naphthalene acetic acid (ANA). However, the best callus production was observed in nodal segments. Both explants tested after callus genesis resulted in bud formation when *calli* were sub-cultured in MS with the presence of BAP or Kinetin.

In our study, there was also callus genesis with a different auxin. Zhu *et al.* (2018) induced callus formation, and subsequent regeneration of plants from young leaves explants of *Paeonia suffruticosa* Andr. The best medium for callus genesis was the MS added with 0.2 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 3 mg L⁻¹ of thidiazuron (TDZ), and *calli* differentiated abundantly when they were sub-cultured in MS + 2 mg L⁻¹ of BAP * 0.2 mg L⁻¹ of ANA + 0.3 mg L⁻¹ of TDZ. This research agrees with that of Zhu *et al.* (2018), who obtained callus from young leaves explants in MS medium with a higher concentration of 2,4-D (2 mg L⁻¹), and with BAP and TDZ replacement.

Sub-culture of *calli* in fresh culture medium

Callus formation started around 20 d after the leaf explant was in TN and TM enriched with activated charcoal. Under these conditions, callus growth was slow until 30 d. However, when *calli* were sub-cultured in TN and TM without presence of activated charcoal, the cell mass started to increase, and reached a remarkable size after two weeks in the medium (Figure 3). This, compared with the

Estudios sobre la respuesta *calogénica* de diferentes especies vegetales existen, en los cuales se aplicaron reguladores de crecimiento de auxinas y citoquininas para multiplicar individuos. Así, Kumlay y Ercisli (2015) evaluaron el efecto de reguladores de crecimiento en explantes de segmentos nodulares y de tejido foliar de *Solanum tuberosum*; encontraron el desarrollo de la calogénesis en ambos explantes con medio de cultivo DM con 3 mg L⁻¹ de bencil amino purina (BAP) + 2 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA). Sin embargo, la producción mejor de callo se observó en los segmentos nodulares. Ambos explantes probados después de la calogénesis dieron lugar a la formación de yemas cuando los callos se subcultivaron en MS con la presencia de BAP o Kinetina.

En nuestro estudio, también hubo calogénesis con una auxina diferente. Zhu *et al.* (2018) indujeron la formación de callos y la posterior regeneración de plantas a partir de explantes de hojas jóvenes de *Paeonia suffruticosa* Andr. El mejor medio para la calogénesis fue el MS adicionado con 0.2 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) + 3 mg L⁻¹ de tidiazurón (TDZ), y los callos se diferenciaron en modo abundante cuando se subcultivaron en MS + 2 mg L⁻¹ de BAP * 0.2 mg L⁻¹ de ANA + 0.3 mg L⁻¹ de TDZ. Esta investigación coincide con la de Zhu *et al.* (2018), quienes obtuvieron callo a partir de explantes de hojas jóvenes en medio MS con una mayor concentración de 2,4-D (2 mg L⁻¹), y con sustitución de BAP y TDZ.

Subcultivo de *callos* en medio de cultivo fresco

La formación de callo comenzó alrededor de 20 d después de que el explante de hoja estuviera en TN y TM enriquecido con carbón activado. En estas condiciones, el crecimiento del callo fue lento hasta los 30 d. Sin embargo, cuando los callos se subcultivaron en TN y TM sin la presencia de carbón activado, la masa celular comenzó a aumentar y alcanzó un tamaño notable después de dos semanas en el medio (Figura 3). Esto, en comparación con los subcultivos en presencia de carbón activado, en los cuales se produjo un efecto negativo sobre la multiplicación celular en el callo, y la aparición de tejido con presencia de oxidación fenólica.

De acuerdo con Peña-Ramírez *et al.* (2011), los tipos de callos que se formaron son los de clase III y VI (Figura 4). Los de clase VI son callos friables ya que estos se separan con facilidad. Cuando se sub

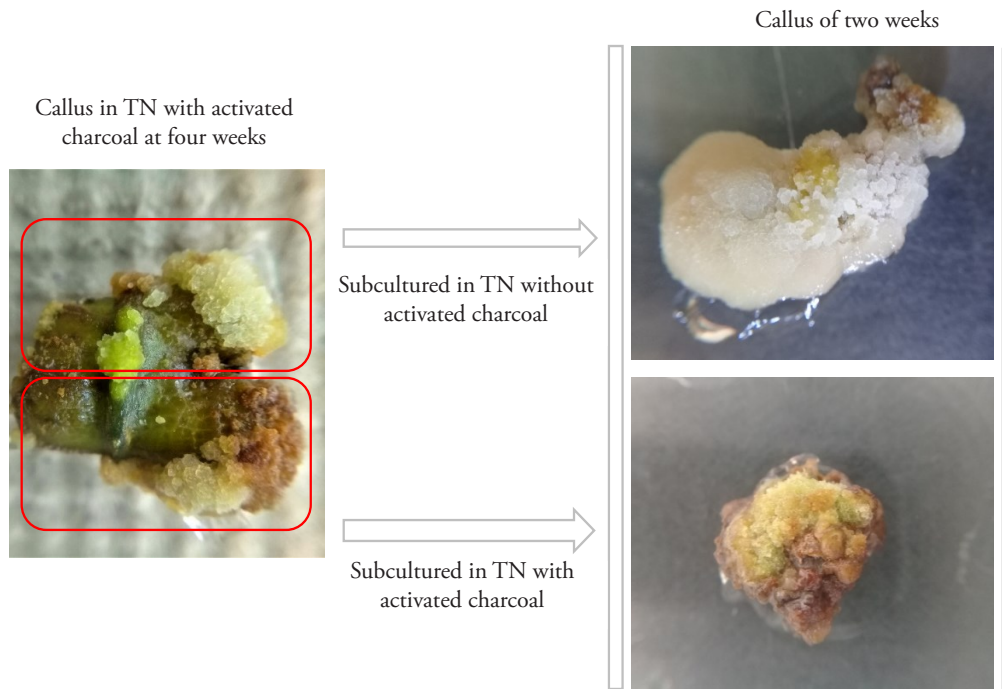


Figure 3. Effect of the presence of activated charcoal in the subculture.
Figura 3. Efecto de la presencia de carbón activado en el subcultivo.

subcultures in the presence of activated charcoal, in which there was a negative effect on the cell multiplication in the callus, and the appearance of phenol-saturated tissue.

According to Peña-Ramírez *et al.* (2011), types of *calli* formed are class III and VI (Figure 4). Those of class VI are friable *calli* since these are separated easily. When they are sub-cultured, they multiply in volume, and after their growth, they separate from their original explants (Figure 4B). While class III are structures that can become crystalline, hyperhydrated, globular shaped with a pale green color, they can also reproduce and may have pre-embryogenic structures (Figure 4E). These characteristics described by those authors match with the *calli* obtained in our study.

Calli growth in continuous presence of activated charcoal showed slow cellular proliferation (Figure 3). This coincides with what was observed in the induction of *calli* of *Oryza sativa* L. (Chutipaijit and Sutjaritvorakul, 2018). These results suggest that presence and concentration of activated charcoal in the culture medium will be a factor to determine the speed of cell proliferation in the callus genesis process in foliar explants of *B. alicastrum*.

cultivan, se multiplican en volumen, y tras su crecimiento, se separan de sus explantes originales (Figura 4B). Mientras que la clase III son estructuras que pueden llegar a ser cristalinas, hiper hidratadas, de forma globular con un color verde pálido, también pueden reproducirse y pueden tener estructuras pro-embriogénicas (Figura 4E). Las características descritas por esos autores coinciden con los callos obtenidos en nuestro estudio.

El crecimiento de callos en presencia continua de carbón activado mostró una proliferación celular lenta (Figura 3). Esto coincide con lo observado en la inducción de callos de *Oryza sativa* L. (Chutipaijit y Sutjaritvorakul, 2018). Estos resultados sugieren que la presencia y concentración de carbón activado en el medio de cultivo será un factor que determinará la velocidad de proliferación celular en el proceso de callogénesis en explantes foliares de *B. alicastrum*.

CONCLUSIONES

El método utilizado para la eliminación de microorganismos en explantes foliares de *Brosimum alicastrum* tuvo una eficiencia del 80% y no causó

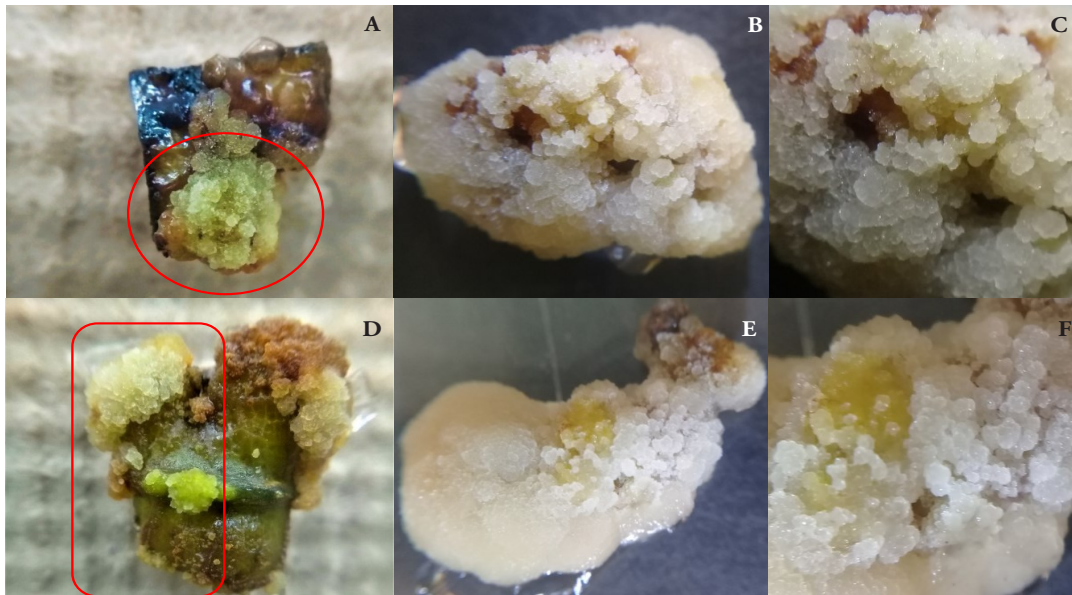


Figure 4. Cell proliferation on the sub-cultured *calli*. A) Callus formed in TM + activated charcoal at 4 weeks before subculture. B) Cellular mass in TM without activated charcoal at 2 weeks after subculture. C) Amplification of image B. D) Callus in TN + activated charcoal at 4 weeks before subculture. E) Cellular mass in TN without activated charcoal at 2 weeks after subculture. F) Amplification of image E. The red parts delimit the parts that were sub-cultured.

Figura 4. Proliferación celular en los *callos* subcultivados. A) Callo formado en TM + carbón activado a las 4 semanas antes del subcultivo. B) Masa celular en TM sin carbón activado a las 2 semanas del subcultivo. C) Ampliación de la imagen B. D) Callo en TN + carbón activado a las 4 semanas antes del subcultivo. E) Masa celular en TN sin carbón activado a las 2 semanas del subcultivo. F) Ampliación de la imagen E. Los trazos rojos delimitan las partes que se sub cultivaron.

CONCLUSIONS

The method used for the elimination of microorganisms in foliar explants of *Brosimum alicastrum* had an efficiency of the 80% and did not cause structural damage. For callus induction the best treatment, that promoted the formation of friable callus with embryogenic potential, was that coded as TN, which integrates Benzylaminopurine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, at described concentrations, for 20 days.

For the multiplication in the subculture stage, TN treatment without activated charcoal stimulated the emergence of pre-embryogenic structures at 14 days. Cell proliferation rate was negatively affected by the presence of 3 grams activated charcoal in the culture medium. *In vitro* establishment, and *calli* production of *Brosimum alicastrum* generate an essential advance for subsequent researches in organogenesis or somatic embryogenesis to regenerate this tree.

daños estructurales. Para la inducción de callo, el tratamiento mejor que promovió la formación de callo friable con potencial embriogénico fue el codificado como TN, el cual integra bencilaminopurina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético en las concentraciones descritas, durante 20 días.

Para la multiplicación en la etapa de subcultivo, el tratamiento TN sin carbón activado estimuló la generación de estructuras pro-embriogénicas a los 14 días. La tasa de proliferación celular se vio afectada negativamente por la presencia de 3g de carbón activado en el medio de cultivo. El establecimiento *in vitro*, y la producción de callos de *Brosimum alicastrum* generan un avance esencial para investigaciones posteriores en organogénesis o embriogénesis somática para regenerar este árbol.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

LITERATURE CITED

- Cardoso, J. C., L. T. S. Lee Gerald, and J. A. Teixeira da Silva. 2018. Micropropagation in the twenty-first century. *In*: Loyola-Vargas, V. M. and N. Ochoa-Alejo (eds). Plant Cell Culture Protocols. Humana Press. New York, NY. pp: 17-46.
- Chutipajit, S., and T. Sutjaritvorakul. 2018. Application of activated charcoal and nanocarbon to callus induction and plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L). *Chem. Spec. Bioa.* 30:1-8
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Guan, Y., S. G. Li, X. F. Fan, and Z. H. Su. 2016. Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Front. Plant Sci.* 7: 938.
- Herman, E. B. 2015. Recent advances in plant tissue culture XXI. Media and techniques for growth, regeneration and storage: 2011–2015. Agritech Consultants Inc., Shrub Oak, NY. 148 p.
- Hernández-González, O., S. Vergara-Yoisura, y A. Larqué-Saavedra. 2015. Primeras etapas de crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw. en Yucatán. *Rev. Mex. Ciencias Forest.* 6: 38-49.
- Junairiah, P., E. S. Wida-Utami, N. Matuzahroh, and L. Sulistyorini. 2018. Callus induction of *Piper betel* Var Nigra using 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzil aminopurin. *Biosaintifika.* 10: 588-596.
- Kumlay, A. M., and S. Ercisli. 2015. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotech. Biotechnol. Equip.* 29: 1075-1084.
- La Jornada. 2013. El árbol ramón, opción viable de alimentación; complementa al maíz. Julio 24: e1-e2. <https://www.jornada.com.mx/2013/07/24/ciencias/a02n1cie>. (Consulta: diciembre 2019).
- Meiners, M., C. Sánchez, y S. De Blois. 2009. El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *Biodiversitas* 87: 7-10.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Peña-Ramírez, Y. J., I. García-Sheseña, Á. Hernández-Espinoza, A. Domínguez-Hernández, F. A. Barredo-Pool, J. A. González-Rodríguez, and M. L. Robert. 2011. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 105: 203-209.
- Phillips, G. C., and G. B. Collins. 1984. Red clover and other forage legumes. *In*: Evans, D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 2. MacMillan Publ, New York, N. pp: 169–210.
- Phillips G. C., and M. Garda. 2019. Plant tissue culture media and practices: An overview. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 55: 242–257
- Ramírez-Sánchez, S., D. Ibáñez-Vázquez, M. Gutiérrez-Peña, M. Ortega-Fuentes, L. García-Ponce, y A. Larqué-Saavedra. 2017. El Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) una alternativa para la seguridad alimentaria en México. *AgroProductividad* 10: 80-84.
- Riaz S., A. Hussian-Shah, S. Ul-Malook, and Q. Ali. 2016. Study of dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzylaminopurine callus development in *Cucurbita moschata*. *Mol. Pl. Br.* 7:1-12.
- Zhu, X., X. Li, W. Ding, S. Jin, and Y. Wang. 2018. Callus induction and plant regeneration from leaves of peony. *Hort. Environ. Biotech.* 59: 575-582.