

ARTÍCULO ORIGINAL

EL 2,4-D COMO INDUCTOR DE EMBRIONES SOMÁTICOS A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS DE *Carica papaya*

2,4-D AS AN INDUCER OF SOMATIC EMBRYOS IN IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS OF *Carica papaya*

Julio Chico-Ruíz¹, Ana Vega-Huamán¹, Alfredo León-Alayo¹; Lisi Cerna-Rebaza², Luis Gonzales-Llontop³, Manuel Rodríguez-Lacherre⁴

¹Laboratorio de Cultivos Celulares. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

²Laboratorio de Biología. American School. Trujillo-Perú.

³Facultad de Educación. Universidad Nacional Toribio Rodríguez Mendoza. Chachapoyas-Perú.

⁴Laboratorio de Fitopatología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.

Autor para correspondencia: jchico@unitru.edu.pe

RESUMEN

El uso de la embriogénesis somática para la propagación masiva de plántulas in vitro seguirá en aumento, según halla protocolos más avanzados, capaces de producir embriones somáticos morfológicamente normales, sin variación y con capacidad para germinar, y convertirse en plantas con eficacia y rapidez. Con esa premisa se utilizó el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como inductor de embriones somáticos en embriones cigóticos inmaduros de *Carica papaya*. Los explantes se obtuvieron de frutos inmaduros que presentaban semillas de color blanco y fueron introducidos en MS complementado con 2,4-D a concentraciones de 23, 45 y 68 μM , respectivamente. Los resultados muestran que los callos embriogénicos se desarrollaron mejor a 23 μM de 2,4-D (34%) y con la misma concentración se obtuvieron embriones somáticos (88%) a los 70 días. Se observó también las diferentes etapas de formación del embrión: globular, torpedo y cotiledón. Se concluye que el 2,4-D, si es capaz de inducir embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros.

Palabras clave: *Carica papaya*, embriogénesis somática, 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

ABSTRACT

The use of somatic embryogenesis for the massive propagation of seedlings in vitro will continue to increase, according to more advanced protocols, capable of producing morphologically normal somatic embryos, without variation and with the ability to germinate, and become plants efficiently and quickly. With this premise, 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) was used as an inducer of somatic embryos in immature zygotic embryos of *Carica papaya*. The explants were obtained from immature fruits that presented white seeds and were introduced in MS supplemented with 2,4-D at concentrations of 23, 45 and 68 μM , respectively. The results show that embryogenic callus developed better at 23 μM of 2,4-D (34%) and with the same concentration somatic embryos (88%) were obtained at 70 days. The different stages of embryo formation were also observed: globular, torpedo and cotyledon. It is concluded that 2,4-D is capable of inducing somatic embryos from immature zygotic embryos.

Key words: *Carica papaya*, somatic embryogenesis, 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D).

Recibido: 28 de agosto de 2020. **Aceptado:** 28 de octubre de 2020. **Publicado online:** 30 de diciembre de 2020.

INTRODUCCIÓN

Carica papaya L. (Caricaceae), es una especie de las regiones tropicales y subtropicales de América y África, su propagación es por semilla, causando una considerable variabilidad en una población comercial. El fruto, la papaya, tiene propiedades nutricionales, nutraceuticas, con actividades de comercio muy favorables para productores, y se prevé que en un futuro podrá ser un agente portador de vacunas (Rodríguez *et al.*, 2014). Sin embargo, este cultivo presenta problemas en la disponibilidad de variedades que cumplan con la demanda del mercado, las enfermedades causadas por virosis, fitoplasmas y antracnosis, y además requiere altos niveles de fertilización y pesticidas, entre otros factores que afectan su producción (Posada *et al.*, 2009). Una alternativa para solucionar estos problemas es el cultivo de tejidos vegetales utilizando sistemas de micropropagación, como la organogénesis y embriogénesis somática, para producir en biorreactores numerosas plantas con características de homogeneidad.

La embriogénesis somática es posible, ya que cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión somático (totipotencia); a través, de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores de crecimiento (Freire, 2003). Estos embriones somáticos germinan y dan origen a individuos completos con el fenotipo de la planta donante de la célula inicial (Marinuci *et al.*, 2004). Entre las ventajas que ofrece la producción de embriones somáticos está: una elevada capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, que permite obtener en un solo proceso estructuras completas, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente; otras ventajas, es la bipolaridad que distingue a los embriones como plantas individuales; la similitud en diferentes niveles de organización (morfológico, fisiológico y bioquímico) con sus contrapartes sexuales y su capacidad para producir una planta nueva durante los procesos de germinación y conversión (Elhiti *et al.*, 2013)

La embriogénesis somática puede ser directa e indirecta. La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (ej. nucela de cítricos). La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (Guan *et al.*, 2016). El proceso ocurre en dos etapas: en la primera fase, células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos). En la segunda fase, una vez repicados los centros embriogénicos a un medio sin auxinas, éstos proliferan de forma lenta e indiferenciada. Luego se producen una serie de divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, que al crecer pasan por los estados de corazón y torpedo, y tras una fase de maduración y germinación darán lugar a plantas completas (Elhiti *et al.*, 2013; Azcón & Bieto, 2004)

Las auxinas y citocininas son las dos principales fitohormonas implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2008). El efecto de las auxinas es producir elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo); también, está relacionado con el proceso de inducción de las raíces adventicias, inhibición en la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos de suspensión; la concentración de éstas, es relativamente amplia sin causar efectos fitotóxicos en el material tratado. Con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces adventicias; mientras, que con altas concentraciones de auxinas no se producen raíces y tiene lugar, en cambio, la formación de callo. Las auxinas más utilizadas son: el ácido naftalenacético (ANA), ácido indol butírico (IBA) y 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4- D) (Fehér *et al.*, 2003).

Revisando experiencias realizadas similares a esta investigación, encontramos el de Fernando *et al.* (2001), quienes utilizaron embriones cigóticos maduros cultivados en 2

mg/L. 2,4-D Beraún (2014) desarrolló callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo cv. PTM-331 y cv. Tainung y a los 60 días obtuvo estructuras proembrionarias cuando utilizaba 2,4-D en los medios de cultivo. Gheno (2000) utilizó embriones cigóticos inmaduros de papaya de 60 a 90 días de edad, las mejores respuestas se produjeron en los embriones cigóticos provenientes de la zona proximal (produjo 300 embriones somáticos por embrión cigótico inicial) con 0.8 mg/L de 2,4-D. Cabrera (2013) desarrolló el proceso de inducción de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo de la variedad PTM-331, a los 90 días en medios con 10 mg/L y 8 mg/L de 2,4-D. Rodríguez (2008) estandarizó un protocolo para la obtención de plantas de *C. papaya* L. variedad Maradol rojo a partir de embriones cigóticos inmaduros. Logró los mayores valores (12.8 ± 0.2) en el coeficiente de multiplicación de los embriones somáticos obtenidos al emplear 5 mg/L de 2,4-D. Gutiérrez *et al.*, (2006), desarrollaron un sistema de regeneración eficiente para plantas de papayo variedad PT-101-B vía embriogénesis somática con 10 mg/L de 2,4-D.

La importancia en la inducción de embriones somáticos radica en que está ampliamente considerada como la mejor vía de regeneración y el método más eficiente de multiplicación clonal de plantas que se ha desarrollado hasta la fecha. Además, se puede emplear tanto en especies que se producen por semillas como en aquellas de propagación vegetativa. Por lo expuesto en el presente trabajo, se demostró que el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es capaz de inducir embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon embriones cigóticos inmaduros, extraídos de semillas de frutos inmaduros recolectados de plantas adultas de *C. papaya* "papaya" seleccionadas por sus características morfológicas, provenientes del campus universitario. (Fig. 1).

El explante requirió de necesidades nutricionales y hormonales, por los que el medio basal que se utilizó fue Murashige & Skoog (1962), el cual estuvo suplementado con sales minerales, vitaminas, sacarosa al 3% y fitagel al 0.5%. Se ajustó el pH entre 5.5 a 6.5. Luego se esterilizó en autoclave durante 30 minutos con 15 libras de presión y 121 °C.

Para lograr la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros, se analizaron diferentes concentraciones del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los tratamientos fueron T₁:0, T₂:23, T₃: 45 y T₄: 68 μ M

El establecimiento in vitro de los explantes se realizó bajo condiciones de asepsia y esterilización. Se colocó las semillas en placas con papel filtro estéril y se procedió a realizar cortes para obtener el embrión e introducirlos en los frascos preparados con los tratamientos respectivos. Los frascos sembrados se llevaron a incubación en un ambiente controlado a temperatura entre 25-28° C, y en oscuridad total. Después de 10 días se colocaron en fuente luminosa (cuatro fluorescentes de luz blanca, 40watts, cada uno) y fotoperiodo de 16:8 y a temperatura ambiente ± 21 °C.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para establecer el efecto del regulador de crecimiento sobre los explantes, se formularon cuatro tratamientos cada uno con tres repeticiones, cada tratamiento consistió de cincuenta unidades experimentales a las cuales se evaluó periódicamente, cada 10 días.

Se evaluó la presencia de embriones somáticos (ES) y callos por explante. También se midió la longitud de los embriones y se observó las diferentes etapas de su desarrollo (micro y macroscópica), las cuales fueron globular, torpedo y cotiledón. Además, se hizo un análisis histológico de los callos y ES, para lo cual se tomó un explante de cada tratamiento, y en) y

cada 10 días. Luego se conservaron en solución AFA para posteriormente procesarlos mediante el corte histológico (secciones de 8-10 μM) utilizando un micrótopo. Para la coloración se utilizó safranina (1% de p/v) en 50% (v/v) de etanol y hematoxilina al 2%. Las observaciones se realizaron con un microscopio NIKON 400X, estereoscopio OLYMPUS y una cámara digital CANON (12.1 megapíxeles) para las tomas fotográficas.

Los datos fueron procesados para determinar promedios y análisis de varianza (ANAVA) con una probabilidad de error del 5 %, y establecer las diferencias significativas entre los tratamientos asignados.

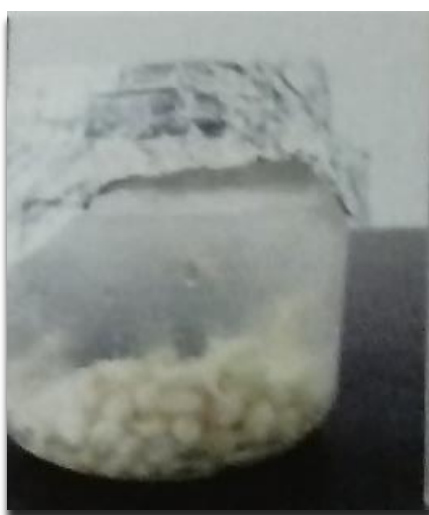


Fig. 1. Semillas inmaduras desinfestadas, de color blanco. En cuyo interior están los embriones inmaduros, también de color blanco.

RESULTADOS

En todos los tratamientos se obtuvieron embriones somáticos, diferenciándose en el número de embriones formados, Así, en la Tabla 1 observamos que a menor concentración de 2,4-D hay un mayor desarrollo y formación de callos en T₂ (23 μM de 2,4-D); en cambio, a mayor concentración (68 μM) se obtuvieron pocos callos (19%). Igualmente, en T₂ a los 70 días encontramos 88% embriones somáticos formados, lo cual fue el más elevado de todos los tratamientos (Tabla 2). El ANAVA confirma la diferencia estadística con $p < 0.05$.

De los embriones somáticos obtenidos se los agrupó en embriones normales, secundarios y deformes (Tabla 3), en el análisis entre tratamientos encontramos que el mayor número de embriones somáticos normales (57%) están en 23 μM y también la que producía la mayor cantidad de embriones secundarios (60%) y deformes (67%), le sigue el tratamiento de 68 μM . Lo interesante es que la concentración intermedia es la que menor producción de embriones somáticos presentaba. Cuando hacemos el análisis por tratamiento la concentración de 23 μM de 2,4-D producía embriones somáticos normales (66%) al igual que la de 68 μM (74%); pero, la de 45 μM produjo el más alto porcentaje de embriones secundarios (60) y también los de mayor longitud (0.29), tampoco se observaron embriones deformes en esta concentración.

De los cortes histológicos realizados se observaron células grandes alargadas con bordes obtusos, citoplasma denso en un tejido normal de embrión cigótico inmaduro (Fig. 2). A los 20 días de cultivo en medio de inducción; se observaron desarrollo y formación de callos (Fig. 3 a). Por divisiones sucesivas, se observaron células pequeñas, agrupadas y núcleos muy visibles, son los nuevos tejidos meristemáticos (Fig. 3b). Los callos embriogénicos mostraron la formación de embriones en diferentes estados de desarrollo:

globular (Fig. 3d), corazón (Fig. 3c), torpedo y cotiledonar (Fig. 4); el embrión globular estaba representado por una masa compacta de células de división muy activa y rodeada de una bien definida epidermis (Fig. 3d). También se observó la diferencia en el desarrollo de los embriones somáticos, estos pueden ser normales o agrupados en este caso cuando los embriones se sobreponen entre ellos (Fig. 4).

Tabla 1. Porcentaje de callos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya* "papaya" a los 30 días utilizando 2,4-D.

Tratamientos (2,4-D)	N° de unidad experimental	N° de callo	%
0 μM (T ₁)	50	0	--
23 μM (T ₂)	32	11	34
45 μM (T ₃)	17	4	24
68 μM (T ₄)	27	5	19

Tabla 2. Porcentaje de embriones somáticos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya* "papaya" a los 70 días.

Tratamientos (2,4-D)	N° de unidad experimental	N° de embriones*	%
0 μM (T ₁)	50	0	--
23 μM (T ₂)	18	53b	88
45 μM (T ₃)	10	4c	20
68 μM (T ₄)	15	31d	30

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0.05$

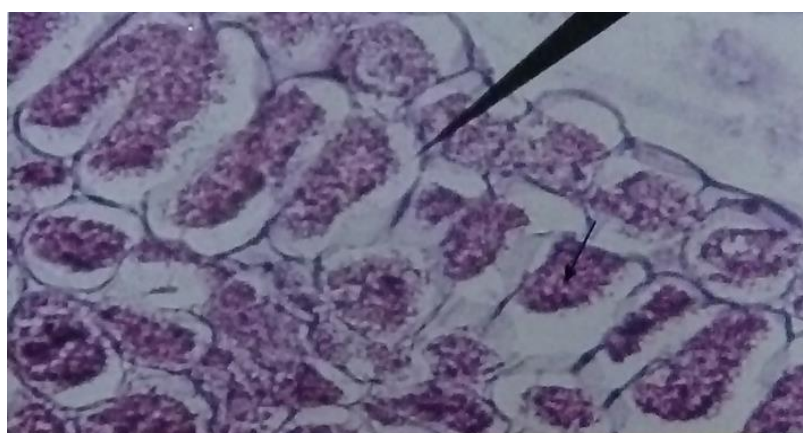


Fig. 2. Corte histológico de embriones inmaduros de *C. papaya* con citoplasma muy denso (flecha), células ordenadas y de forma definida. Coloración hematoxilina, aumento a 400X.

Tabla 3. Promedio de embriones (%) y su longitud axial (mm) por tratamiento y entre tratamientos, obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya* "papaya" a los 70 días.

TIPO DE EMBRION		Tratamientos (μM)			
		23	45	68	Total (unidades)
Normal	N° de embriones (%)	57	3	40	58
		66	40	74	
	Medida (mm)	<i>0,23</i>	<i>0,14</i>	<i>0,14</i>	
Secundarios	N° de embriones (%)	60	12	28	25
		30	60	23	
	Medida (mm)	<i>0,17</i>	<i>0,29</i>	<i>0,11</i>	
Deforme	N° de embriones (%)	67	--	33	3
		4		3	
Total (unidades)		50	5	31	86

Leyenda: Cifras resaltados con negro (entre tratamientos), se lee horizontalmente y están en porcentajes; las cifras no resaltadas se leen verticalmente (por tratamiento) y están en porcentajes. Los totales están expresados en unidades, por individuos. Las cifras en cursivas expresan las medidas de los embriones somáticos.

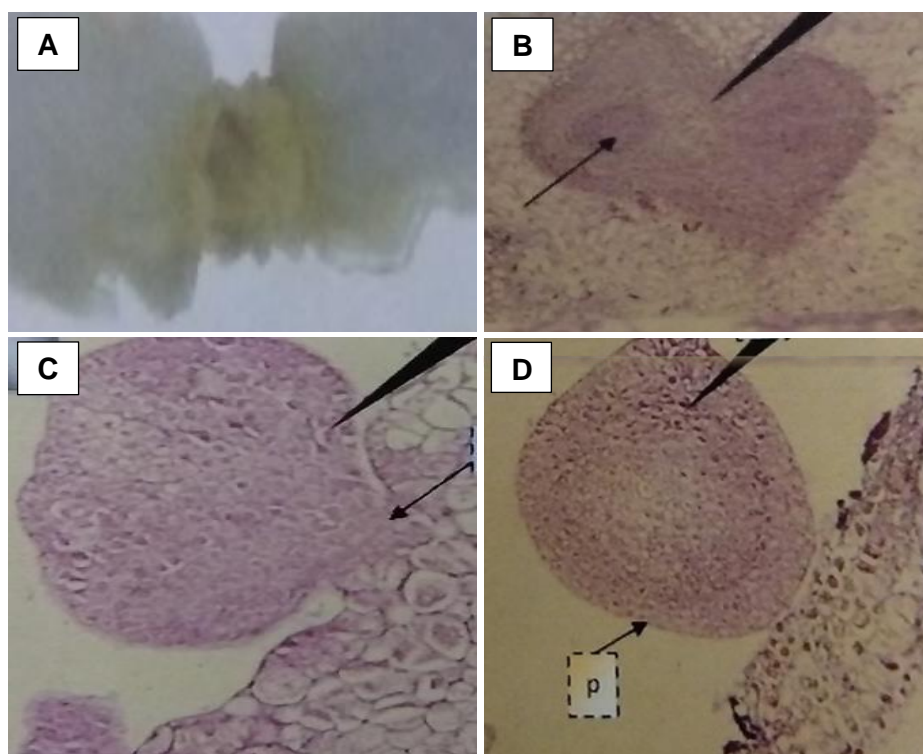


Fig. 3. Callos embriogénicos procedentes de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya*, (a). Diferenciación de tejidos en una estructura meristemática (b) con células muy pequeñas en división; embrión en forma de corazón (c) y globular (d). (p) epidermis. Cortes histológicos realizados con micrótopo. Coloración hematoxilina-safranina.

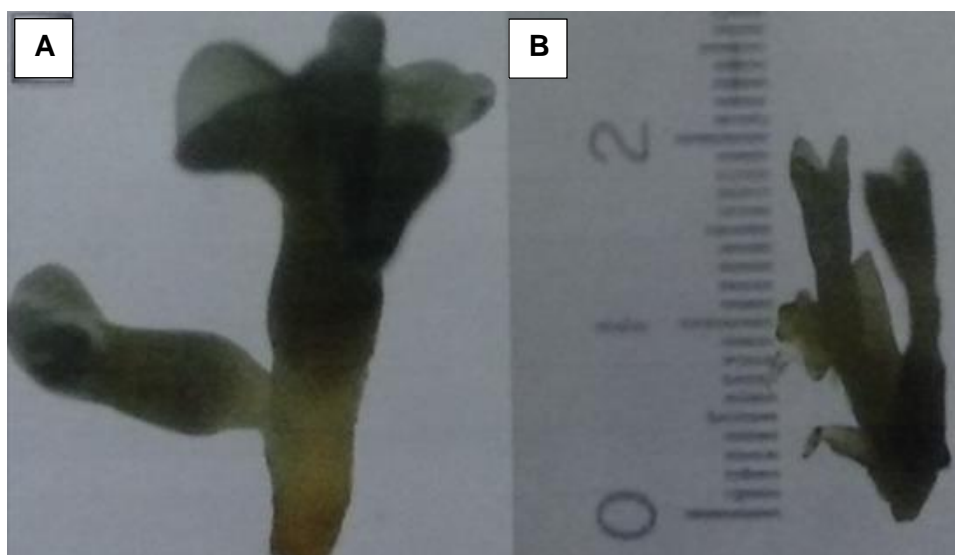


Fig. 4. Diferenciación de embriones somáticos de *C. papaya* vistos al estereoscopio a) embrión cotiledonar normal; b) embriones agrupados. Aumento 80X.

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos, en la concentración de 23 μM (Tabla 2) se produjo el mayor porcentaje de explantes con callos embriogénicos. Con ello se evidencia que el 2,4-D es una auxina adecuada para inducir la formación de callo y la producción de agregados embriogénicos en "papaya" (Tabla 3) ratificando así la importancia de la concentración de auxinas para el crecimiento de los callos y la formación de los embriones (Sauer *et al.*, 2013, Gonzalez *et al.*, 2002). La formación de un callo, en este caso a partir de embriones cigóticos inmaduros, no es considerada una regresión en el desarrollo de su linaje sino una apertura para incrementar su desarrollo potencial (Feher 2019, Niazián *et al.*, 2019) y si los callos no manifiestan ese cambio es debido a su poca capacidad de regeneración (Bajaj & Rajam 1996; Gondo *et al.* 2017). Además, el cambio del estado somático a embriogénico y subsecuente estados de desarrollo del embrión somático implica una dinámica celular coordinada, cambios bioquímicos y epigenéticos que conducen a una reprogramación de los patrones de expresión genética y, en consecuencia, reprogramar el perfil temporal y espacial del proteoma (Aguila-Hernández & Loyola-Vargas, 2018).

El 2,4-D actúa como una efectiva sustancia estresante apuntando al desarrollo embriogénico en los cultivos de células vegetales (Jimenez, 2004, Malabadi *et al.*, 2011). También se piensa, que la aplicación del mismo (2 4 D) modifique la polaridad celular por interferencia de, gradiente eléctrico y del pH alrededor de las células. Por lo tanto, ello indica, la importancia que posee determinar el tipo y concentración del regulador del crecimiento adecuado para inducir el proceso embriogénico (Pasternak *et al.*, 2002). En papaya, los genes relacionados al transporte polar de la auxina (AUX1/LAX y genes de la familia PIN) son expresados desde las etapas iniciales de la embriogénesis somática (Estrella-Maldonado *et al.*, 2018), y su regulación puede afectar la inicial polarización de las células del callo como su inducción o interrumpir la inducción del proceso embriogénico. Resultados similares fueron obtenidos cuando se inducen callos en cultivar CO7 usando la misma concentración de 2,4-D, e igualmente, alto valor de este regulador reduce el porcentaje en la formación de callos (Anandan *et al.*, 2012).

Las células embriogénicas se presentan de forma redondeada con paredes relativamente gruesas, citoplasma denso, núcleo prominente; caracteres típicos de células meristemáticas

y proembriogénicas. Estas características también han sido descritas en otro cultivo, como en *Cocos nucifera*, donde obtuvieron el aislamiento y diferenciación de células embriogénicas y proembriones (con proteínas y almidón), a una concentración de 5×10^{-4} M 2,4-D (Macdonald, 1997). Cada uno de estadios observados fue histológicamente similar a las formas embriogénicas descritas para café (Menéndez & García, 1997) tabaco (Gill & Saxena, 1993), batata (Zheng *et al.*, 1996) y dicotiledóneas en general. Las secciones longitudinales a través de los embriones en todos los estados de desarrollo revelaron la ausencia de conexiones vasculares entre los tejidos embrionarios y los tejidos parentales subyacentes. Las anomalías en la formación de cotiledones están asociadas con desigualdades y estructuras irregulares (Fig. 5). Según Homhuana *et al.* (2008) en sus experiencias reportan que 68 μ M de 2,4-D conduce a anomalías de los embriones, y por consecuente de las plantas, pues al realizar un análisis RAPD encontraron bandas monomórficas y polimórficas.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se evidencia que tanto el tipo de auxina como la concentración de la misma se relaciona estrechamente con la formación de los callos con estructuras embriogénicas en "papaya", una posible respuesta puede estar dada, porque este tipo de regulador del crecimiento y su concentración afecta el tipo de división y la polaridad de la célula, mecanismos importantes en la formación de las células embriogénicas.

CONCLUSIONES

- La concentración 23 μ M de 2,4-D fue la que promovió el mayor número de embriones somáticos en *C. papaya* a partir de embriones cigóticos inmaduros.
- El tiempo para la formación y desarrollo de los embriones somáticos fue de 70 días, con un 88% de éxito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Hernandez, V. & V. Loyola-Vargas.** 2018. Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis, *Front. Plant Sci.* 9: 1658, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01658>
- Anandan, R.; D. Sudhakar; P. Balasubramanian & A. Gutiérrez-Mora.** 2012. In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Sci. Hortic.* 136, 43–49. doi: 10.1016/j.scienta.2012.01.003
- Azcón, J. & M. Bieto.** 2004. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edición Universitaria de Barcelona. España.
- Bajaj, S. & M. Rajam.** 1996. Polyamine accumulation and near loss of long-term callus cultures of morphogenesis of rice (restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels. *Plant Physiol* 112:1343–1348.
- Beraún, Y.** 2014. Inducción in vitro de callos embriogénicos con diferentes suplementos orgánicos y reguladores de crecimiento en semillas inmaduras de papayo (*Carica papaya* L.), CV. PTM - 331 Y CV. TAINUNG". Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 83 p.
- Cabrera, P.** 2013. Inducción de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (*Carica papaya* L.). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 79p.
- Elhiti, M.; C. Stasolla & A. Wang.** 2013. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. In *Vitro Cell.Dev.Biol. Plant* 49:631-642.

- Estrella-Maldonado, H.; L. Posada-Pérez; M. Talavera; C. Barredo; R. Gómez-Kosky & J. Santamaría.** 2018. The expression of CpAUX1/LAXs and most of the long-distance CpPINs genes increases as the somatic embryogenesis process develops in *C. papaya* cv. "Red Maradol". *J. Plant Growth Regul.* 37, 502–516. doi: 10.1007/s00344-017-9746-y
- Feher, A.; T. Pasternak & D. Dudits.** 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201–228
- Feher A.** 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front Plant Sci* 10:536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fernando, A.; M. Murilo & K. Marli.** 2001. La anatomía de embriogénesis somático en *Carica papaya*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, .44 (3)
- Freire, M.** 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3 (4): 195 – 209.
- Gheno, Y.** 2000. Morfogénesis *in vitro* de *Carica cauliflora* Jacq.". Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. Córdoba. México. 170 p.
- Gill, R. & P. Saxena.** 1993. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Report* 12: 154-159
- Gondo, T.; N. Umami; M. Muguerza & R. Akashi.** 2017. Plant regeneration from embryogenic callus derived from shoot apices and production of transgenic plants by particle inflow gun in dwarf napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.). *Plant Biotechnol* 34:143–150. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnol.17.0623a>
- González, G.; S. Alemán; F. Barredo & M. Robert.** 2002. Embriogénesis Somática. *Biotecnología Vegetal*, 2(1): 3-8.
- Guan, Y.; L. Shui-Gen; F. Xiao-Fen & S. Zhen-Hong.** 2016. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Front. Plant Sci.* 7:938. doi: 10.3389/fpls.2016.00938
- Gutiérrez, A.; C. Jiménez & J. Yopez.** 2006. Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. variedad PT-101-B; Tesis de grado. Universidad Agraria La Molina, Lima; Perú.
- Homhuana, S.; B. Kijwijana; P. Wangsomnuka; K. Bodhipadmab & D. Leungc** 2008. Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. *ScienceAsia* 34: 347-352
- Jiménez, V.** 2004. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth regulation* 47: 91-11
- Macdonald, H.**1997. Auxin perception and signal transduction. *Plant Cell Tiss Organ Cult*; 100: 423-430.
- Malabadi, R.; S. Kumar; G. Mulgund & K. Nataraja.** 2011. Induction of somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya*). *Res. Biotechnol.* 2:40-55.
- Marinuci, L.; M. Ruscirti & W. Abedini.** 2004. Morfogénesis *in vitro* de leguminosa forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 105 (2): 27-36.
- Menéndez, A. & E. García.** 1997. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee 'Catimor'. *Protoplasma* 199: 208-214.
- Murashige, T. & F. Skoog.**1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.

- Niazian, M.; M. Shariatpanahi; M. Abdipour & M. Oroojloo.** 2019. Modeling callus induction and regeneration in an anther culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) using image processing and artificial neural network method. *Protoplasma* 256:1317–1332. doi: 10.1007/s00709-019-01379-x
- Pasternak, T.; E. Prinsen; F. Ayaydin; P. Miskolczi; G. Potters; H. Asard; H. van Onckelen; D. Dudits & A. Fehér.** 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 129:1807-1819.
- Posada, L.; A. Rodríguez & R. Kosky.** 2009. Influencia de la época del año y el tipo de frasco en la embriogénesis somática en papaya. *Biología Vegetal* 9(1): 33-40.
- Rodríguez, A.** 2008. Estandarización de un protocolo para la embriogénesis somática de *Carica papaya* L. var. Maradol Rojo. Tesis de Maestría. Universidad Central “Marta Abreli” de las Villas. Cuba. 96 p.
- Rodríguez, J.; Y. Díaz; A. Pérez; Z. Cruz & P. Rodríguez.** 2014. Evaluación de la calidad y el rendimiento en papaya silvestre (*Carica papaya* L.) de Cuba. *Cultivos Tropicales* 35 (3):36-44.
- Sauer, M.; S. Robert & J. Kleine-Vehn.** 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9): 2565-2577.
- Wang, W.; X. Zhao & G. Zhuang.** 2008. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae); *Plant Cell Tiss Organ Cult* 95: 57 - 67.
- Zheng, Q.; A. Porobo & C. Prakash.** 1996. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 15:381-385.