

**INDUCCION DE EMBRIONES SOMATICOS A PARTIR DE HOJAS DE
Capsicum chinensis, UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO Y 6-BENCIL AMINO PURINA**

*Induction of somatic embryos from leaves *Capsicum chinensis*, using different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzyl amino purine*

Brenda Alva-Guzmán^{*}, Lisi Cerna-Rebaza de Chico^{}, Julio Chico-Ruíz^{**}**

Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

brendak209@hotmail.com^{*}, jchico22@gmail.com^{**}

RESUMEN

Capsicum chinensis L. conocido como "Aji Panca" es útil por sus propiedades pungentes y aromáticas; en seco se le utiliza, como base para las salsas y pastas, estimulante digestivo, sazonzador y como antioxidante en carnes y otros; lo que demuestra ser un recurso de amplísimo rango de aprovechamiento para su industrialización y menor pérdida con relación al fruto fresco. La experiencia se inició con la siembra de semillas en macetas con tierra preparada y musgo. A los 25 días se introdujo dos pedazos de hojas jóvenes en medio basal (MS) con 2,4 – D a 1ppm y 0.5 ppm. Los callos obtenidos fueron traspasados a un nuevo medio suplementado con 2,4-D y BAP. Los resultados muestran que los callos embriogénicos se desarrollaron mejor en 1 ppm de 2,4 –D con un 76 % de desarrollo a los 16 días. El mejor tratamiento, para el desarrollo de los embriones, fue el de 5ppm de BAP a los 56 días de estar en dicho tratamiento. Además, se observó las diferentes etapas globular, acorazonada, torpedo, por las que pasa el embrión. Se concluye que la mejor combinación para la inducción de embriones somáticos en *Capsicum chinensis* es la de 1ppm de 2,4-D para formar callos embriogénicos y 5ppm de BAP en el crecimiento del embrión.

Palabras claves: *Capsicum chinensis*, 2,4 – Diclorofenoxiacético (2,4 –D), Bencil amino purina (BAP), Embriogénesis

ABSTRACT

Capsicum chinensis L., known as "Aji Panca", is useful for its pungent and aromatic properties; it is used in dry conditions as a base for sauces and pastas, it is a digestive stimulant and an antioxidant in seasoning meats and others; what proves to be a very wide range useful resource for industrialization and lower loss compared to fresh fruit. The experience started with seeds sowing in pots with prepared soil and moss. At 25 days two pieces of young leaves were introduced into basal medium (MS) with 2, 4-D at 1 ppm and 0.5 ppm. The calli were transferred to a new supplemented medium with 2, 4-D and BAP. The results show the embryogenic callus best developed to 1 ppm of 2, 4-D with a 76% growth at 16 days. The best treatment, for the embryos development, was 5 ppm BAP, 56 days of being in treatment. Also It was observed different stages, globular, heart-shaped, torpedo in the embryos process. This research concludes that the best combination for the induction of somatic embryos in *Capsicum chinensis* is 1 ppm of 2, 4-D to form embryogenic callus and 5ppm BAP to embryo growth.

Keywords: *Capsicum chinensis*, 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Benzyl amino purine (BAP), embryogenesis

Recibido: 05 de Mayo de 2014

Aceptado: 01 de Agosto de 2014

INTRODUCCIÓN

Para varios países del trópico americano, *Capsicum chinensis* conocido como "ají panca" es una de las hortalizas de mayor importancia económica principalmente en las regiones agrícolas de México y Perú. Los autores también argumentan que su contenido nutricional es alto y son una buena fuente de vitaminas, particularmente de vitamina C y de pro vitamina A en tipos picantes.¹ Es una fanerógama del orden Tubiflorales; en el Perú esta especie es muy conocida y utilizada en su actividad culinaria. Actualmente por sus propiedades pungentes y aromáticas se le utiliza en seco, como base para las salsas y pastas, estimulante digestivo, sazonador, como antioxidante en carnes y otros; lo que demuestra ser un recurso de amplísimo rango de aprovechamiento para su industrialización y menor pérdida con relación al fruto fresco.¹

Con la embriogénesis somática cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores de crecimiento.² Estos embriones somáticos germinan y dan origen a individuos completos con el fenotipo de la planta donante de la célula inicial.³ Entre las ventajas que ofrece la producción de embriones somáticos están: una elevada capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, que permita obtener en un solo proceso estructuras completas, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente; la característica de bipolaridad que distingue a los embriones como plantas individuales; la similitud en diferentes niveles de organización con sus contrapartes sexuales y su capacidad para producir una planta nueva durante los procesos de germinación y conversión⁴

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 explanto primario se desarrollan para formar embriones. 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.⁵

Se pueden obtener embriones somáticos de diversas partes de la planta como de células vegetativas (ápices radiculares, hipocótilos, peciolos, pedúnculos, hojas jóvenes, etc.), de tejidos y órganos con características embrionarias (embriones cigóticos), meristemáticos o reproductivas (embriones e inflorescencias inmaduras, trozos de esqueleto, nucela y endosperma, óvulos, tejido ovárico); o de callos producidos de cualquiera de los anteriores.⁶

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.⁷

Las citocininas son sustancias químicas que regulan la división celular, casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas contienen adenina. Una buena fuente la constituyen los frutos y semillas inmaduras y los

hidrolizados de t_{RNA} de plantas, animales y microorganismos. Entre las más conocidas está la bencilaminopurina.⁸

Se realizaron estudios sobre la embriogénesis somática inducida *in vitro* en explantes de hoja cultivadas de crisantemo cv. euro, el cual se incubó en medio de Murashige y Skoog (MS) complementado con 2,0 mg/L de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético y 2,0 mg /L de cinetina , obteniéndose el número más alto de embriones ((42 ± 5,97) por explante después de 5 semanas de cultivo.⁹

En *Stevia* se obtuvieron embriones somáticos a partir de hojas cultivadas *in vitro* en medio MS con 2,4 –D (10 o 25 μM), BAP (1 μM) y sacarosa (120 g/L). Se observó embriones somáticos 15 días después de la iniciación del cultivo.¹⁰

También en *Manihot esculenta* se hizo inducción de embriogénesis somática a partir del cultivo de hojas inmaduras. Los mejores medios fueron: MS + 2 % de sacarosa + 6 mg/L de picloram.

El porcentaje de germinación de los embriones somáticos varió entre 2 -50 % y la conversión a plantas 2 – 30%. Se obtuvieron plantas completas en cuatro clones (MCol 1505, 76, 30 y MPar 75), las que fueron transferidas exitosamente al suelo.¹¹

Entre papaya (*Carica papaya* L.) ha sido utilizada en muchas ocasiones para el estudio con el objetivo de establecer un protocolo de embriogénesis somática, la aclaración de los efectos de sacarosa y ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4 - D) en la inducción de cultivos embriogénicos y el efecto de polietilenglicol (PEG) en la maduración de embriones somáticos. Por ejemplo con diferentes concentraciones de sacarosa (30 y 60 g L⁻¹) y 2,4 - D (0, 20, 40 y 80 mM) se ha demostrado que la combinación de 30 g L⁻¹ sacarosa y 20 mM de 2,4- D tiene como resultado las tasas más altas de inducción y los mayores diámetros de callos. Además, esta combinación fue asociada con el mayor potencial para formar embriones somáticos.¹²

La embriogénesis somática de *Capsicum* ha sido obtenida de embriones cigóticos inmaduros.^{13, 14,15} embriones cigóticos maduros¹⁶, o de primera hojas completamente expandidas de plantas de semillero.¹⁷ Sólo hay dos reportes de indirectos de embriogénesis somática^{16, 18} con *C. annum* y *C. chinense*, respectivamente. En todos los demás casos, se obtuvieron embriones directamente de tejidos. Sin embargo, la resistencia del género *Capsicum*, a la regeneración de plantas enteras *in vitro* ha sido ampliamente documentado por numerosos informes.^{13, 14, 17, 19, 20,1, 21} La resistencia del género *Capsicum* es que se manifiesta por la baja eficiencia de los protocolos de regeneración¹⁶, la alta tasa de embriogénesis somática deformada²⁰ y la baja tasa de germinación y la conversión de las embriogénesis somática en plantas.^{20,22}

En otras investigaciones se produjeron embriones somáticos de los hipocótilos de *Capsicum chinense* en diferentes concentraciones de 2,4 – ácido diclorofenoxiacético (0, 4, 5, 9,05 μM) y en varios tiempos de exposición en la auxina (15, 30, 45, 60 días) en medio líquido. Los resultados mostraron una nueva perspectiva prometedora en la regeneración *in vitro* de esta especie. Contrariamente a lo que ha sido informado hasta la fecha para el género *Capsicum*, éste presenta un mayor potencial embriogénico *in vitro*.²³

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la inducción de embriones somáticos a partir de hoja de *Capsicum chinensis*, utilizando diferentes concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencil amino purina (6-BAP)

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Material vegetal

Se utilizó semilla certificada la cual posteriormente se desinfectó por inmersión con alcohol comercial de 70° por 10 minutos, luego se sembró las semillas en macetas con tierra preparada y musgo en la proporción de 2:1 respectivamente. Cada maceta tuvo entre 10 a 15 semillas. El riego fue interdiario a condiciones de capacidad de campo y la temperatura e iluminación en condiciones de laboratorio.

B. Medio Basal

El medio basal para todos los tratamientos fue Murashige y Skoog²⁴, el cual estuvo a la mitad de su concentración y suplementado con sacarosa (3%), fitagel (0.3%) y reguladores del crecimiento (2,4 -D y BAP). El pH del medio basal se ajustó a 5.6 a 6.5 con NaOH 1N ó HCl 1N. Luego el medio basal se autoclavó durante 30 minutos a 15 libras de presión y 121°C

C. Tratamientos

Se realizó en dos etapas:

Primera etapa: Inducción de callos

Se introdujo hojas jóvenes de 1cm de lado en placas Petri conteniendo medio basal (MS) más 2,4 -D a concentraciones de 1ppm y 0.5 ppm. En total fueron 400 explantes.

Segunda etapa: Inducción de embriones

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, para establecer el efecto de los reguladores del crecimiento. Los callos obtenidos de la primera etapa fueron trasplantados a un nuevo medio en la cual se combinaban diferentes concentraciones de BAP y 2,4 -D (Tabla 1). Cada matraz tuvo 1 callo, se hizo 20 repeticiones por tratamiento.

Condiciones de incubación

Las placas se llevaron a incubación en un ambiente controlado a temperatura entre 25 ± 2 °, y en oscuridad total. Después de 10 días se colocaran en fuentes luminosas (cuatro fluorescentes de luz blanca, 40 watts, cada uno) y fotoperiodo de 16:8 y a temperatura ambiente ± 21 °C

Tabla 1. Diferentes concentraciones de las hormonas BAP y 2,4-D por tratamiento

Tratamientos	Reguladores del crecimiento (mg/l)	
	BAP	2,4-D
1	0	0
2	5	0
3	5	0.1
4	10	0
5	10	0.1
6	15	0
7	15	0.1

D. Evaluación

- Color y forma del callo

- Número de callos
- Fases del embrión
- Número de embriones por callo
- Presencia de almidón utilizando lugol.

Análisis Histológico

Para el análisis del proceso de diferenciación se escogió 1 explante de cada tratamiento cada 10 días. Los explantes se conservaron en solución AFA y luego de 24 horas se procedió al 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 microscópicas de los cortes histológicos se realizaron en un microscopio Nikon 400x, estereoscopio OLYMPUS y cámara digital Panasonic (10 megapíxeles) respectivamente.

E. Análisis Estadístico

Los resultados se presentaron en promedios y porcentajes

RESULTADOS

A los 10 días de cultivo, se observó un enrollamiento de la hoja en el tratamiento de 1ppm de 2,4-D. En forma simultánea, la lámina de la mayoría de las hojas empezó a tornarse de color café. Entre los 16 a 30 días de cultivo se observó la formación de protuberancias que mostraban una coloración verdoso amarillento, que indica la formación de callos obtenidos en baja intensidad luminosa (Fig. 1). En cambio, los callos tratados en 0,5 ppm de 2,4 – D demoraron 20 a 40 días

A los 30 días de estar en 2,4 –D y posteriormente 10 días en 5 ppm de BAP es evidente la formación de gran cantidad de estructuras globulares similares a la fase inicial de la formación de embriones somáticos (Fig. 2).

Los mejores resultados de inducción callogénica se obtuvieron con el tratamiento 1ppm de 2,4 –D los cuales fueron más reactivos en la formación de callo con un 76% de desarrollo (Tabla 3), presentando diferencias morfológicas evidentes, en donde las más frecuentes fueron translúcidos, friables y de color amarillo (Tabla 2). Los colores predominante fueron amarillo claro (39.21 %) y verde claro (35.29%); la forma fue extendida en todo el explante no presentando forma definida (52.9%); la consistencia laxa (64.70%) y con 7 callos por explante, en promedio. El 72.85% de los callos obtenidos correspondieron al tratamiento de 1 ppm de 2,4-D (Tabla 3).

La Fig. 3 muestra los explantes foliares con y sin tratamiento. En los explantes sin tratamiento el mesófilo tiene células grandes redondas y ordenadas. En cambio cuando el explante se somete al 2,4-D se observa células pequeñas (meristemoides) los cuales originarán los embriones. En la Fig. 4 y 5 se observaa el desarrollo de los embriones en sus diferentes formas, globulares y torpedos. La tabla 4 muestra el número de embriones obtenidos en cada tratamiento. La mejor concentración e sla de 5 ppm de BAP pues hay 45% de embriones obtenidos. El menor número de embriones (8%) se obtuvo en las cocrntraciones que contenían 2,4-D (0.1 ppm).

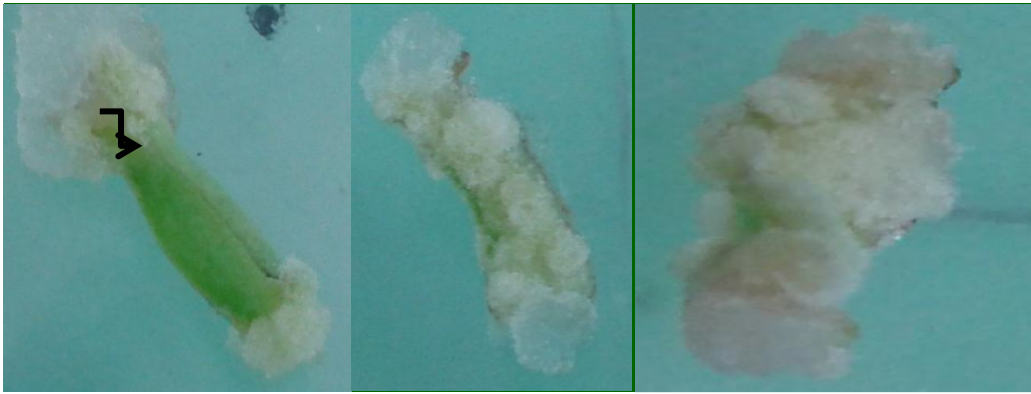


Fig. 1. Inicio y desarrollo de callos en hojas de *C. chinensis* (16 y 30 días respectivamente). Los explantes estuvieron previamente en 1 ppm de 2,4-D .

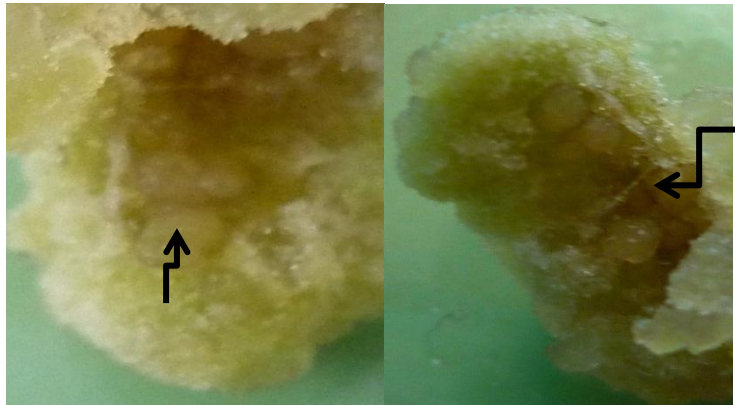


Fig. 2. Crecimiento del embrión emergiendo del tejido calloso previo tratamiento en 1ppm 2,4 –D (31 días) y luego en 5 ppm de BAP(45 días)

TABLA 2. Características observadas en explantes expuestos a 2,4-D durante 10 días en oscuridad

CARACTERÍSTICA		1ppm		0.5 ppm	
Color	Amarillo claro	20	39.21%	2	25%
	Verde claro	18	35.29	5	62.5
Forma	Redondas (formes)	13	25.49	1	12.5
	Extendido(deformes)	27	52.9%	8	100%
	En extremos (formes)	24	47.05	0	
Consistencia	Laxo	33	64.70	0	
	Compacto	18	35.29	8	100%
		7		2	
Callo por explante					

Tabla 3: Número de callos obtenidos a partir de hojas jóvenes de *C. chinensis* a los 16 días, utilizando 2,4 – D

TRATAMIENTO	Nº DE UNIDAD	Nº DE CALLO	%
EXPERIMENTAL			
1 ppm	70	51	72.85
0,5 ppm	70	10	14.28

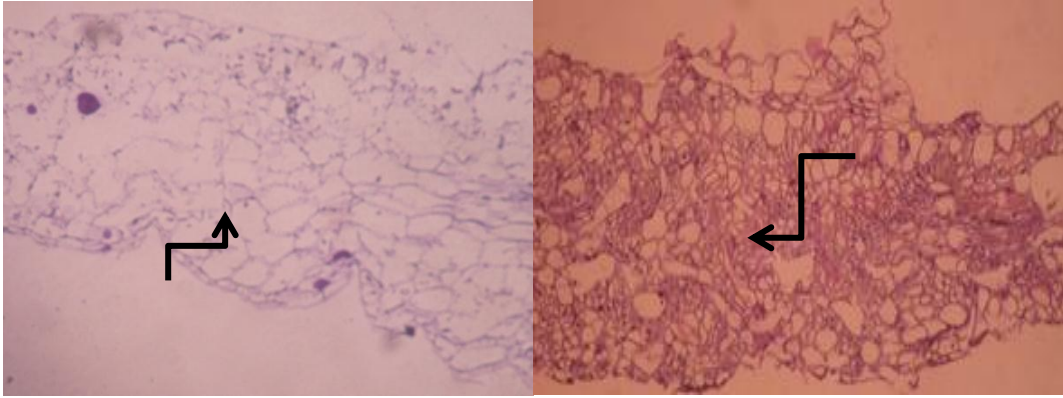


Fig. 3. Hoja de *C. chinensis* sin tratamiento hormonal. Se observa células del mesófilo grandes y ordenadas (izquierda). Callo en 1 ppm de 2,4 - D por 24 días. Se observa células grandes normales y pocas y células pequeñas en división celular (flecha, derecha). 400x. Coloración hematoxilina

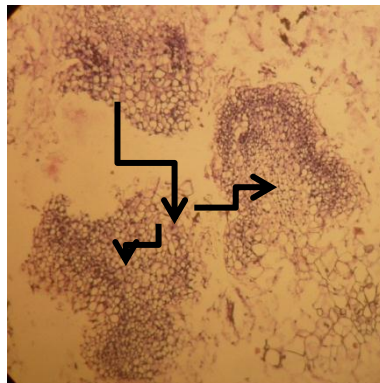


Fig. 4. Desdiferenciación celular para dar origen a los embriones somáticos. Tratamiento de 21 días en 2,4 -D (1 ppm) y 10 días en 5ppm de BAP. 400x. Coloración hematoxilina

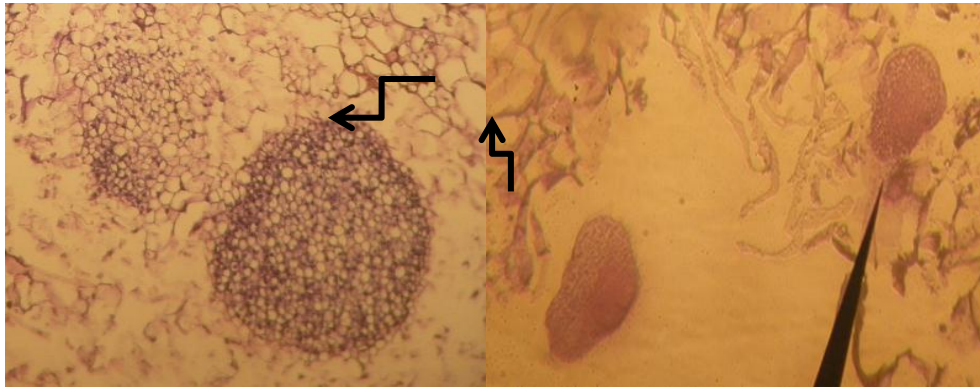


Fig. 5. Embriones globulares (izquierda) y) Callo de 21 días en 1 ppm de 2,4 -D y 10 días en 5 ppm BAP. Embriones torpedo (derecha). Tratamiento de 16 días en 1ppm de 2,4 -D y 30 días en 15 ppm BAP.

Tabla N° 4: Embriones somáticos obtenidos de hojas de *C. chinensis* a los 56 días

TRATAMIENTO	N° DE UNIDAD EXPERIMENTAL	N° DE EMBRIONES PROMEDIO	%
0 ppm	20	0	0
5 ppm BAP	20	45	45%
5 ppm BAP * 0,1ppm 2,4 – D	20	20	20%
10 ppm BAP	20	10	10%
10 ppm BAP * 0,1ppm 2,4 – D	20	8	8%
15 ppm BAP	20	11	11%
15 ppm BAP * 0,1ppm 2,4 – D	20	8	8%

DISCUSIÓN

El estudio morfológico y anatómico de la embriogénesis somática a partir de hojas jóvenes de *C. chinensis* muestra que los eventos morfogénicos conducen a la micropropagación de esta especie, al respecto, investigadores afirman que son dos los requerimientos importantes en la inducción de embriones somáticos en plantas superiores; primero, la presencia de reguladores de crecimiento como las citoquininas y auxinas que participan en la dinámica del ciclo celular²⁶ y, segundo, el uso de tejidos jóvenes como yemas, inflorescencias o regiones basales de hojas, los cuales presentan alta actividad meristemática.²⁷ Además la expresión de embriogénesis somática depende de la especie, cultivar, y condiciones fisiológicas de la planta donadora²⁹ balance de los reguladores del crecimiento, condiciones osmóticas, pH, concentración de aminoácidos y sales, tratamiento de calor y con varias sustancias químicas.^{36,42}

La formación de callos en los tratamientos por influencia de 2,4-D, establece una de las vías para la obtención de embriones somáticos. Cada célula mesofílica puede teóricamente, reaccionar contra las modificaciones del medio o estimula su inducción y estas señales determina una nueva polaridad vía efectos sobre las redes de los microtúbulos, la síntesis de ADN y mitosis, prerequisites para la inducción embriogénica esto explicaría el desorden de las células somáticas en el mesófilo de la hoja. Además el 2,4-D parece actuar como una efectiva sustancia estresante apuntando al desarrollo embriogénico en el cultivo de células vegetales. Este puede regular la embriogénesis somática por una fuerte actividad auxínica, que en forma directa o indirecta, influencia en el metabolismo endógeno de las fitohormonas.^{30,37} Los cambios se manifiestan debido a que la auxina promueve divisiones longitudinales y transversales para formar pequeñas células isodiamétricas. Estas células se alargan para desarrollar las diferentes fases que llevará a la formación del embrión somático. Estos cambios frecuentemente aparecen por efecto de la composición de la pared celular y a su organización interna.^{29 38,39} Además los callos empiezan a ser más abundantes por las continuas divisiones del mesófilo (Fig. 1, 2). La presión, hacia fuera, por las células que se multiplican, empuja a las células que emigran por los estomas abiertos en la epidermis baja (abaxial) e interrumpe esta capa epidérmica.^{28 38,39,40} Los cortes histológicos de la hoja de *C. chinensis*, demostraron la ocurrencia de la embriogénesis somática en el tejido, esta aparición también ha sido reportada en callos tratados con BAP en *Bactris gasipaes* producidos a partir del cultivo *in vitro* de ápices caulinares³², en callos de *Xanthosoma*

*sagittifolium*³³ y en callos de *Zea mays*.³⁴ La explicación para la ocurrencia de estos eventos está dada por el uso de los reguladores de crecimiento, evidentemente si el medio contiene citocininas, las cuales son consumidas más lentamente, entonces lo que sucede, una vez que las auxinas han sido consumidas, es que se promueve la formación de brotes.⁴⁴ Como se pudo observar en las células comenzaron a dividirse manteniéndose limitadas por una pared relativamente gruesa dando así inicio a los embriones somáticos (Fig. 4). Durante la transición de la etapa globular a torpedo es una señal de simetría bilateral (Fig. 5), la cual se caracteriza por el cese del crecimiento uniforme y por la iniciación de los cotiledones. En la mayoría de las especies estudiadas, la adición de reguladores de crecimiento es necesario para inducir embriones somáticos y las auxinas y las citoquininas son claves en la determinación de la respuesta embriogénica, probablemente por su decisiva participación en la regulación del ciclo y división celular.⁴¹ Además hay una relación de interacción con otras hormonas endógenas como ABA, etileno y ácido giberélico produciendo al final cambios en el desarrollo embriogénico. Estos cambios pueden ocurrir directamente (a través de síntesis de enzimas) o en forma indirecta (a través de efectores).^{41,43} Finalmente, hay que destacar la importancia de continuar con el desarrollo de nuevos estudios para determinar aquellos factores que regulan la etapa de maduración de los embriones inducidos de *C. chinensis*, su posterior germinación y la obtención de las plántulas. En esta etapa final es indispensable realizar estudios genéticos para determinar si en el proceso de embriogénesis somática se inducen variantes somaclonales.

CONCLUSIONES

- La concentración que promovió el mayor número de callos en hojas de *C. chinensis* fue de 1ppm de 2,4 -D a los 16 días y con el 76%
- La concentración que promovió el mayor número de embriones somáticos en *C. chinensis* a partir de hojas jóvenes fue 5ppm de BAP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kothari S., Kachhwaha A., Ochoa N. 2010. Chilli peppers— a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnol Adv* 28(1):35–48.
2. Freire S. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las plantas; Universidad Central Marta Abreu de las Villas.
3. Marinuci L., Ruscitti M. y Abedini W. 2004. Morfogénesis in vitro de leguminosa forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la facultad de Agronomía, La Plata*.
4. Chico J., Cerna L. 2012. Cultivo in vitro de las plantas forrajeras. Trujillo, Perú.
5. Azcón J., Bieto M. 2004. Fundamentos de fisiología vegetal. Universidad nacional de Barcelona
6. López G., Canto A., Barredo F., Zapata P., Montalvo M., Barahona F., Santana N. 2006. Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for in vitro regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience* 41(6):1–7.
7. Sivori E., Montaldi E., Caso O. 1986. Fisiología Vegetal. Argentina.
8. Soberon J., Quiroga N., Sampietro A., Vattuone A. 1995. Citocininas. Universidad nacional de Tucuman. Argentina
9. Aung H., Chang K., Baek J., Jo Y., Ki B.. 2012. Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* cv. Euro.
10. Buyukalaca S, Mavituna F. 1996. Somatic Embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tissue Org Cult* 46:227–235.
13. Harini I., Sita L. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*C. annuum* L). *Plant S*
14. Binzel M, Sankhla N, Joshi S, Sankhla D. 1996. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 15:536–540.
15. Schuabb A., Moura E., Barroso T., Santa C., Silveira V.. 2013. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN. Brasil.
16. Jo J., Choi E., Choi D., Lee K. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*C. annuum* L.). *J Plant Biol* 39:127–135.
17. Kintzios S., Drossopolous J., Lympelopoulos C. 2001. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell Tissue Org Cult* 67:55–62.
18. Zapata Y., Canto A., Lopez G., Solis A., Barahona F., Santana N. 2007. Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions. *HortScience* 42(2):1–5.
19. Ochoa N., Ramirez R. 2001. In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37(6):701–729.
20. Steinitz B., Kušek M., Tabib Y., Paran I., Zelcer A. 2003. Pepper (*C. annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:296–303.
21. Aviles S., Lecona C., Acanto A., López C., Santana N.. 2012. Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium.
22. Heidmann I., Lange B., Lambalk J, Angenent G., Boutilier K. 2011. Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Rep* 30:1107– 1115.
23. Kaparakis G., Alderson P. 2008. Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)? *J Plant Growth Regul.* 27:110–114.
24. Murashige T. y Skoog F. 1962. A revise médium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultura. *Physiol Plant*.

25. Bernal J., Minora Y., Ganosa L.; "Inducción de embriones somáticos de explantes de hoja de *Stevia rebaudiana*"; Área de eco – fisiología, Instituto agronómico de Paraná, Londrina 1992.
26. Hutchinson, M.J.; T. Senaratna; J.M. Tsujita y P.K. Saxena. 1997. Somatic embryogenesis in liquid cultures of a tetraploid *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47, 293-297.
27. Soni, R.; J.P. Carmichael; Z.H. Shah y J.A.H. Murray. 1995. A family of cyclin-D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7, 85-103.
28. Rodríguez R, Álvarez C., Centeno M, Berros B., Rodríguez A. (2005) Embryogenesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. Facultad de Ciencias Forestales.
29. Sharp, W.R.; M.R. Sondahl; L.S. Caldas y S.B. Maraffa. 1984. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2, 268-310.
30. Williams E.G., Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462
31. Komamine A., Matsumo M., Tsukahara M., Fujiwara A., Kawahara R., Ito M., Smith J., Nomura K., Fujimura T. 1985. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In: *Tissue culture in forestry and agriculture*. Ed. by R. Henke, K. Hughes, M. Constatin, A. Holloender. Plenum Press. p. 307-313.
32. Valverde R., Arias O., Thorpe T. 1992. Estudio histológico en callos de pejobaye. *Agronomía Costarricense* 16(2): 225-229
33. Gomez L., Valverde R., Arias O., Thorpe T. 1992. Regeneración de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*) por embriogénesis somática. *Agronomía Costarricense* 16(2): 219-223.
34. McCain J.W., Hodges T.K. 1986. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures. *Bot. Gaz.* 147(4): 453-460.
35. Mithila J., Murch S.J., Krishjan S., Saxena P. 2001. Recent advances in *Pelargonium* in vitro regeneration systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(1): 1-9.
36. Parameswari N. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2007; 90:1–8
37. Chico-Ruiz J, López-Medina E, Cerna-Rebaza L, Condemarín-Montealegre C, Vargas-Aliaga C, García-Zare M. Morfología de callos embriogénicos inducidos a partir de hojas de *Vitis vinifera* var. italia, utilizando reguladores del crecimiento. *REBIOL* 2005; 25(1-2): 49-57
38. Wang TL, Cuming A. Embryogenesis. The generation of a plant. Oxford, UK: Bios Scientific Publish Lmt. 1996.
39. Laparra H, Bronner R, Hahne G. Histological análisis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heisser. *Protoplasma* 1997; 196:1-11
40. Chico-Ruiz J, Cerna-Rebaza L, Tejada-Castillo J, Vega-Anhuamán A. Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa, *Fragaria virginiana*, utilizando ANA y BAP *REBIOL* 2008; 28(2):11-21
41. Jiménez V. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis *Plant Growth Regulation* 47:91–110
42. Chico-Ruiz J, Cerna-Rebaza L, García-Zare M. Producción de semillas sintéticas utilizando explantes no-embriogénicos. *REBIOL* 2006; 26(1-2):4-15
43. Jiménez, V, Thomas C. Participation of Plant Hormones in Determination and Progression of Somatic Embryogenesis *Plant Cell Monogr* (2); A. Mujib · J. Samaj: Somatic Embryogenesis. Berlin: Springer-Verlag. 2005
44. Anzidei M, Bennici A, Schiff S, Tani C, Mori B. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observation of developing embryogenic callus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2000; 61:69-79