

# Callos embriogénicos y proembriones inducidos en cotiledones de *Pouteria lucuma*, var. “seda”, utilizando reguladores del crecimiento

Embryogenic calli and proembryos induced in cotyledons of *Pouteria lucuma*, var. “seda”, using growth regulators

Recibido: noviembre 17 de 2022 | Revisado: noviembre 20 de 2022 | Aceptado: noviembre 28 de 2022

JULIO CHICO-RUPIZ<sup>1</sup>  
CÉSAR MEJIA-LLONTOP<sup>2</sup>  
LISI CERNA-REBAZA<sup>3</sup>  
CLAUDIA DÍAZ-FERNÁNDEZ<sup>4</sup>  
LUIS GONZALES-LLONTOP<sup>5</sup>

## RESUMEN

El lúcumo es un cultivo de interés por su consumo humano y su aplicación industrial, pero hay problemas en su productividad debido a su variabilidad genética. Los cultivos in vitro, en especial la embriogénesis somática, puede ayudar a su mejoramiento, pero primero debemos conocer la competencia del explante. Por tanto, el objetivo es inducir callos embriogénicos y proembriones a partir de cotiledones, maduros e inmaduros, de *Pouteria lucuma* “lúcuma”. Para ello se utilizó el medio de cultivo de Murashige & Skoog suplementado con diferentes combinaciones de benciladenina purina, ácido naftalén acético y 2,4-diclorofenoxiacético. Los resultados muestran que los cotiledones inmaduros forman pro-embryos a los 63 días en T6 y 95 días en T7 (5 ppm BAP y 3 ppm de 2,4-D) y en los cotiledones maduros solo se observaron callos embriogénicos a los 58 días en T7. Se concluye que los cotiledones inmaduros es el explante que muestra mejores respuestas en la formación de callos embriogénicos y pro-embryos.

**Palabras clave:** callo embriogénico, embriogénesis somática, lúcuma, auxinas, citoquininas

## ABSTRACT

Lucumo is a crop of interest for its human consumption and its industrial application, but there are problems in its productivity due to its genetic variability. In vitro cultures, especially somatic embryogenesis can help its improvement, but first, we must know the competence of the explant. With the above, the objective was to induce embryogenic calluses and proembryos from cotyledons, mature and immature, of *Pouteria lucuma* “lúcuma”. For this, the Murashige & Skoog culture medium supplemented with different combinations of benzyl adenine purine, naphthalene acetic acid, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid was used. The results show that immature cotyledons form pro-embryos at 63 days in T6 and 95 days in T7 (5 ppm BAP and 3 ppm of 2,4-D) and in mature cotyledons only embryogenic calli were observed at 58 days at T7. It is concluded that immature cotyledons are the explant that shows better responses in the formation of embryogenic and pro-embryonic calluses.

**Keywords:** embryogenic callus, somatic embryogenesis, lucuma, auxins, cytokinins

<sup>1</sup> Laboratorio de experimentación Vegetal. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología. Universidad Nacional de Santa. Chimbote-Perú.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología. American School. Trujillo-Perú.

<sup>4</sup> Laboratorio de Experimentación Vegetal. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú

<sup>5</sup> Laboratorio de Ciencias. Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza. Chachapoyas-Perú.

Autor para correspondencia E-mail: 2jchico@unitru.edu.pe

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Campus de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de San Martín de Porres. Este artículo se distribuye en los términos de la Licencia Creative Commons Atribución No-comercial – Compartir-Igual 4.0 Internacional (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial contactar a: [revistacampus@usmp.pe](mailto:revistacampus@usmp.pe).

<https://doi.org/10.24265/campus.2022.v27n34.12>

## Introducción

*Pouteria lucuma* (R. & P.), "lúcuma", Sapotaceae, se cultiva en los valles interandinos de Perú, Ecuador y al nivel del mar en Chile (Padilla et al. 2006; Balbi, 2004; Yahia & Gutiérrez-Orozco, 2011). Puede ser utilizada como fruta, harina, tintes, textiles, medicina, etc. (Malca, 2000; Maza-De la Quintana & Paúcar-Menacho, 2020) y como en la mayoría de los árboles, su propagación convencional es por semilla sexual e injertos, pero estos métodos tienen limitaciones como: naturaleza perenne, ciclo de vida muy largo especialmente la fase juvenil, auto incompatibilidad, baja tasa de éxito en la polinización, tiempo de maduración de la semilla muy larga, diferencia clonal en el tiempo de floración, elevado nivel de heterocigocidad y otros, (Franciosi, 1995; Mondal et al., 2005; Córdova-Risco et al., 2017; Quijano & Prieto, 2020).

Con estas referencias se hace necesario realizar actividades de mejoramiento con las técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales, la cual nos va a permitir una propagación rápida, masiva y uniformidad genética.

La regeneración de plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación in vitro (Tripathi et al., 2021; Roca & Mroginski, 1990).

La embriogénesis somática es una técnica eficiente por el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo y además cualquier parte de la planta puede ser inducida a formar embriones somáticos utilizando auxinas y citocininas, los

cuales son los principales reguladores del crecimiento implicadas en la regulación de la división, la diferenciación y especialmente en la inducción de embriones somáticos (Wang et al., 2008; Yu et al., 2008; Martinez et al., 2010).

Investigaciones relacionadas al tema demuestran que utilizar bencilaminopurina (BAP), para la inducción de embriogénesis tiene mejores resultados que las otras citocininas en *Quercus rubra*; *Persea americana*, *Coffea arabica*, *Theobroma cacao*, *Eucalyptus globulus*, *Carica papaya*, *Pinus pinea* (Vengadesan & Pijut, 2009; Vidales-Fernández et al., 2003; Quiroz-Figueroa et al., 2002; Silva et al., 2005; Nugent et al., 2001; Carneros et al., 2009).

En *P. lucuma* se demostró que utilizando plantas jóvenes como explantos se obtienen buenos resultados para la formación de callos y desarrollo de protocolos para su micropropagación, utilizando especialmente kinetina, bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) (Padilla et al., 2006; Jordan et al., 1994, Jordan & Oyanedel, 1992).

Frente a la necesidad de buscar nuevas fuentes vegetales que puedan ser mejoradas y ser utilizadas en el consumo humano o como productos industriales es que se justifica realizar investigaciones que vayan mejorando este cultivo, por ello nos planteamos inducir callos embriogénicos y proembriones a partir de cotiledones de *P. lúcuma* var. "seda", utilizando para ello combinaciones de reguladores de crecimiento.

## Método

Material vegetal: se utilizaron cotiledones de frutos maduros e

inmaduros de lúcuma de la variedad "seda", provenientes del distrito de Moche (Trujillo).

Medio de cultivo y tratamientos: el medio basal fue el de Murashige & Skoog (MS, 1962) a la mitad de su concentración

normal, el cual fue suplementado con reguladores del crecimiento (ANA, BAP y 2,4-D), sacarosa (3%), agar (1%) y pH de 6,5. El MS tuvo combinaciones de reguladores de crecimiento según los tratamientos explicados en la Tabla 1.

### Tabla 1

*Combinaciones de los reguladores de crecimiento para cada tratamiento*

T1: 5 ppm de BAP + 0.5 ppm ANA	T5: 5 ppm de BAP + 0.5 ppm 2,4-D
T2: 5 ppm de BAP + 1 ppm ANA	T6: 5 ppm de BAP + 1 ppm 2,4-D
T3: 5 ppm de BAP + 3 ppm ANA	T7: 5 ppm de BAP + 3 ppm 2,4-D
T4: 5 ppm de BAP + 5 ppm ANA	T8: 5 ppm de BAP + 5 ppm 2,4-D

Introducción del explante, se hicieron cortes longitudinales de los cotiledones (1 x 1 cm), luego se procedió a su desinfección con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 2,5%. Una vez introducido los explantes, estos fueron llevados a una cámara oscura por 20 días, pasado este tiempo se llevaron a la sala de incubación donde recibieron fotoperiodo de 16:8. La temperatura promedio fue de 25° C.

Se evaluó presencia de callos y de proembriones. También se analizaron los tipos de callos, su edad y color que manifestaban. De los proembriones se tuvo en cuenta la edad a partir del momento en que aparecieron. Para el análisis histológico, los callos de 45 y 60 días de edad, fueron fijados en solución AFA (1:1:18, formaldehído, ácido acético glacial, alcohol al 70%) durante 48 horas, luego fueron deshidratados con una serie de grados alcohólicos, clarificados con xileno, embebidos en parafina y finalmente cortadas en secciones de 8-10 µm utilizando un micrótopo rotatorio (LEIC rm2245). Las secciones fueron coloreadas con hematoxilina/eosina (Da Silva et al., 2015). La captura de imágenes fue establecida utilizando un microscopio

de luz. Los datos fueron sometidos a promedios, análisis de varianza y prueba de Duncan con una probabilidad de error del 5%.

### Resultados

De los cotiledones inmaduros se formaron proembriones y de los cotiledones maduros solo se obtuvieron callos con características embriogénicas. Todos los tratamientos tienen BAP (Tabla 1) y en los cuatro primeros, T1, T2, T3 y T4 (Tabla 1 y 2, Fig. 1a) la concentración de ANA varía de 0.5 a 5 respectivamente y entre ellos T2 y T3 presentaron el mayor número de proembriones, 128.0 y 82.0 respectivamente, en cambio en T4 solo hay 3.0.

El otro grupo de tratamientos, T5, T6, T7 y T8 tuvieron 2,4-D en concentraciones de 0.5 a 5 ppm y se observó que el número de proembriones fue aumentando conforme la concentración de 2,4-D también se eleva, pero cuando ambas están a 5 ppm (BAP-2,4-D) solo llegó a 9.0 (T8). Así T4 y T8 no permiten el desarrollo de más proembriones. La mayoría de estos emergieron entre los 63

y 95 días que corresponden a T6 y T7 y el mejor tratamiento fue T7 con 647.

En la Tabla 3 se muestran los callos obtenidos de los cotiledones maduros. En los tratamientos con BAP-ANA ninguno presentó callos con características embriogénicas (CNE) y T2 no produjo callos; en cambio los tratamientos con BAP-2,4-D todos ellos indujeron callos embriogénicos (CE) siendo T7 el que produjo el mayor número de callos

(6.00). El color de los callos CNE fueron rojos, marrones y verdes especialmente en T3; en cambio los callos CE la mayoría de ellos fue de color marrón claro.

En los cortes histológicos se observaron células pequeñas en división, agrupadas, diferenciándose de las células de su alrededor que son más grandes (Fig. 1b). Esto es un indicador que se inició la dediferenciación en los cotiledones. Por ello, observamos callos embriogénicos y pro-embriones.

**Tabla 2**

*Proembriones encontrados en cada tratamiento, procedentes de cotiledones inmaduros de P. lúcuma var. "seda". Los datos son promedio de tres repeticiones\*.*

Tratamiento	Edad (días)	Pro-embriones*	Duncan
T1	122	20.0c	X
T2	123	128d	X
T3	119	82.00 e	X
T4	125	3.00 a	X
T5	119	301.0 f	X
T6	63	343.0 f	X
T7	95	647.0g	X
T8	112	9.0b	X

*Nota.* Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con  $p < 0.05$

**Tabla 3**

*Descripción de los callos, para cada tratamiento, obtenidos de cotiledones maduros de P. lúcuma var. "seda". La evaluación se hizo a partir de los 40 días de edad.*

Tratamiento	Edad (días)	CNE <sup>1</sup>	CE <sup>2</sup>	Callos <sup>3</sup>			D <sup>4</sup>
				R	M	V	
T1	68	2.00	0.00	-	+	-	X
T2	40	0,00	0.00	-	-	-	X
T3	58	3,00	0.00	+	+	+	X
T4	58	1.33	0.00	-	+	-	X
T5	40	0,00	2.00 a	-	+	-	X
T6	68	0,00	4.00 b	-	+	-	X
T7	58	0,00	6.00 c	-	+	+	X
T8	100	0.00	4.00b	-	+	-	X

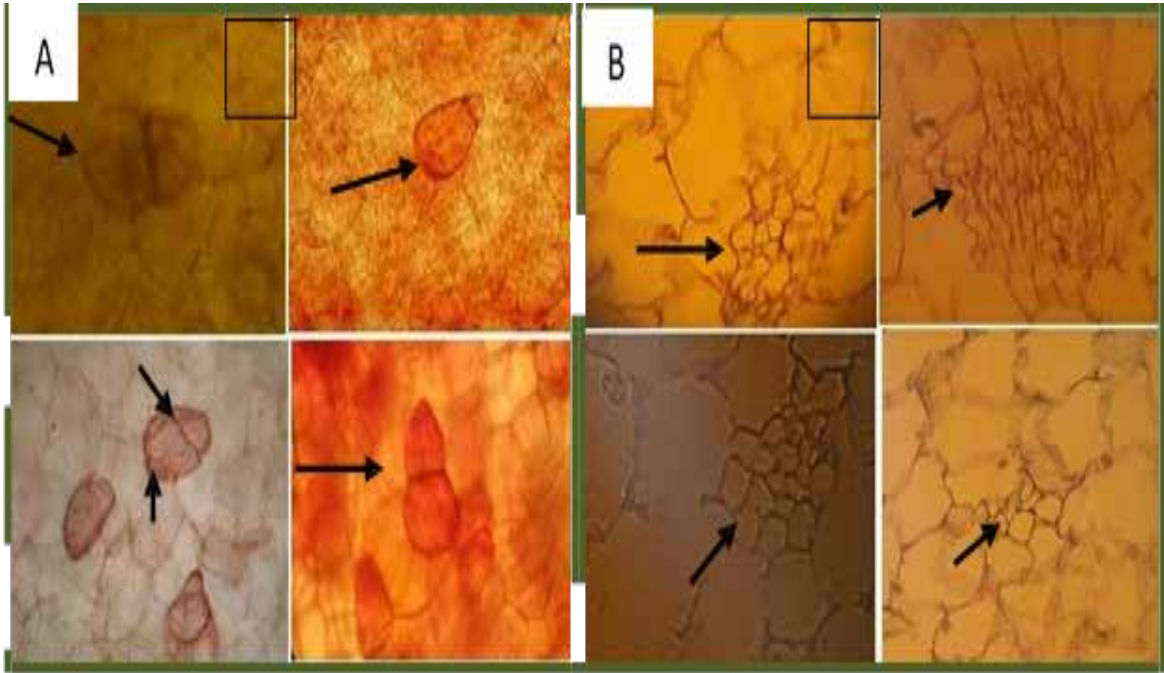
*Nota.* Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con  $p < 0.05$

- <sup>1</sup> promedio de callos no embriogénicos (CNE)
- <sup>2</sup> promedio de callos embriogénicos (CE)
- <sup>3</sup> color de callos. R: rojo; M: marrón; V: verde
- <sup>4</sup> test de Duncan
- + Presente
- Ausente

El análisis ANOVA (Tabla 2 y 3) muestra diferencias significativas entre los tratamientos; en la prueba de Duncan (Tabla 2) se observa tres grupos homogéneos para los tratamientos con cotiledones inmaduros; para los cotiledones maduros (Tabla 3) se presentan dos grupos homogéneos.

### Figura 1

- A. Pro-embriones (flechas) en estado de dos células, procedentes de cotiledones inmaduros *in vitro* de *P. lucuma* var. "seda" (60 días de edad). Vista superficial. Coloración: rojo neutro. Aumento 400x.
- B. Centros embriogénicos (flecha) con células pequeñas en división, Corte transversal de un callo. Coloración: eosina. Aumento 400x.



### Discusión

La presencia de proembriones y callos embriogénicos (Tabla 2 y 3) es debido al tratamiento hormonal, mediante la cual las células inician una ruta de desarrollo específico. Conocer las concentraciones de los principales grupos hormonales, así como la relación entre ellos, en aquellas especies en las cuales se puede inducir fácilmente la embriogénesis somática, podría permitir suplir la deficiencia

o reducir el exceso de uno o más compuestos, para lograr la inducción en especies recalcitrantes para este proceso son los comentarios de Serrano & Piñol, 1991 y Cordero, 2006.

La producción de callos necesita de una auxina como se observa en la Tabla 3, su desarrollo implica expresión de diferentes genes las cuales confieren a las células somáticas su habilidad para manifestar un potencial embriogénico (Thorpe,

1995) con la síntesis de proteínas específicas como las glicoproteínas que pueden afectar el destino de las células embriogénicas en la masa del callo (Chugh & Khurana, 2002) o que dos patrones de genes similares se expresan simultáneamente, pero ocurren en diferentes tiempos (Ghorbani-Marghashi et al., 2012). La adquisición de la competencia embriogénica depende principalmente de su estado fisiológico y condiciones ambientales y a nivel celular por sus condiciones genéticas y de su desarrollo (Feher, 2008; Naz et al., 2017; Fareed et al., 2019).

La formación de un callo, compuesto por mayormente por células uniformes, no es considerado como una regresión en el desarrollo del linaje, pero si es un inicio para incrementar su desarrollo potencial (Feher, 2019). La reprogramación de un callo puede inducir la regeneración de una planta a través de organogénesis o embriogénesis somática (Niazian et al., 2019). El nuevo tejido que se origina en el callo, en forma de células pequeñas y se tiñen intensamente con el colorante, son los nuevos centros embriogénicos que proliferan de forma lenta e indiferenciada (Lee & Pijut, 2017). Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas

del centro embriogénico y se forman los proembriones (Fig. 1b) en las cuales su identidad celular, el destino y la función está determinada por el transcriptoma, por ejemplo, el set completo de transcriptos expresados de ARN (Chen et al., 2019; Czernicka et al., 2021).

De esta manera, podemos decir que el explante utilizado presenta competencia y determinación para iniciar la propagación masiva del lúcumo, aplicando principalmente la embriogénesis somática. Sugerimos establecer un protocolo de propagación que nos permita optar con la hormona adecuada y optimizar el número de días de inducción.

## Conclusiones

El tratamiento con el mayor número de proembriones, para los explantes de cotiledones inmaduros de *P. lucuma* var “seda” fue T7 (5 ppm BAP + 3 ppm 2,4-D) y este mismo fue capaz de inducir 6.0 callos embriogénicos en cotiledones maduros. Se comprueba que el material vegetal debe ser joven para inducir regeneración in vitro y se deben desarrollar nuevos ensayos para obtener los embriones somáticos a fin de mejorar la calidad del fruto.

## Referencias

- Carneros, E., Celestino, C., Klimaszewska, K., Park, Y., Toribio, M. & Bonga, J. (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98: 165 – 178.
- Cordero, L. (2006). Comportamiento de hormonas vegetales en la mira de investigadores. *Crisol Revista de Ciencia y Tecnología de la UCR*. N° 16
- Córdova-Risco, J., Rojas-Idrogo, C. & Delgado-Paredes, G. (2017). In vitro micrografting of lucumo (*Pouteria lucuma*), Sapotaceae. *Environmental and Experimental Biology* 15: 217–224

- Czernicka, M., Iwona, C., Kinga, K., Koziaradzka-Kiszkurno, M., Abdullah, M. & Popielarska-Konieczna, M. (2021). Protuberances are organized distinct regions of long-term callus: histological and transcriptomic analyses in kiwifruit. *Plant Cell Reports* (2021) 40:637–665
- Chen, J., Tong, C., Lin, H. & Fang, S. (2019). *Phalaenopsis LEAFYCOTYLEDONI*— induced somatic embryonic structures are morphologically distinct from protocorm-like bodies. *Front Plant Sci* 10:1594.
- Chugh, A. & Khurana, P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis— recent advances. *Curr. Sci.* 83(6): 715-729.
- Da Silva, G., A. Da Cruz, W., Otoni, T., Pereira, D., Rocha, C. & Da Silva M. (2015). Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:539–545
- Fareed M., Shahzad, M., Nauman, M., Tabassum, B., Tariq, M., Murtaza, S., Ali, S., Raza, A., Raza, S. & Ahamd I. (2019). Evaluation of genotypic and hormone-mediated callus induction and regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L). *International Journal of Botany Studies.* 4(6): 70-76
- Feher, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front Plant Sci* 10:536.
- Feher, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biol. Szegediensis*, 52(1): 53-56.
- Franciosi, R. (1995). El cultivo del lúcumo en el Perú. *Fundeagro.* 86 p.
- Ghorbani-Marghashi M., Gholami, M., Maadankan, R. & Jamshidi H. (2012). The study of 2,4-D and 2,4,5-T effects on gene expression at early stages of embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *African Journal of Biotechnology* 11(12):2889-2903
- Jordan, M., Valenzuela, M. & Velozo, J. (1994). Androgenic responses in the in vitro cultured anthers of *Pouteria lucuma* (R. et Pav.) O. Kze. *Ciencia-e-Investigacion-Agraria* 21(1-2):53-58.
- Jordan, M. & Oyanedel, E. (1992). Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 249-252
- Lee, J. & Pijut, P. (2017), Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Fraxinus nigra*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 130:335–343.
- Malca, O. (2000). Seminario de Agro negocios. Universidad del Pacífico, Facultad de Administración y Contabilidad. <https://docplayer.es/6657195-Lucuma-seminario-de-agro-negocios-abril-2000->

[profesor-oscar-malca-g-omalca-up-edu-pe-integrates-paola-marin-ugarte-kathy-zaragoza-ramos.html](https://profesor-oscar-malca-g-omalca-up-edu-pe-integrates-paola-marin-ugarte-kathy-zaragoza-ramos.html)

- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, L., Gutiérrez, M. & Cetina, V. (2010). Embriogénesis somática *in vitro* en 2 especies de Eucalipto (*Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*). En Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales. Serie Forestal. México: 155-176
- Maza-De la Quintana, R. & Paucar-Menacho, L. (2020). Lúcumá (*Pouteria lucuma*): Composición, componentes bioactivos, actividad antioxidante, usos y propiedades beneficiosas para la salud. *Scientia Agropecuaria* 11(1): 135-142.
- file:///C:/Users/JULIO/Downloads/Lucuma\_Pouteria\_lucuma\_Composition\_bioactive\_compo.pdf
- Mondal, T., Parathiray, S. & Mohan, P. (2005). Micrografting: A technique to shorten the hardening time of micropropagated shoots of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Sri Lanka J. Tea Sci.* 70: 5–9.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 437–497.
- Naz, M., Sughar, G., Soomro, Z., Ahmed, I., Seema, N., Nizamani, G., Saboohi, M. & Nizamani R. (2017). Somatic embryogenesis and callus formation in sugarcane (*Saccharum* SPP L.) using different concentration of 2,4-D and RAPD analysis of plants regenerates. -*Indian Journal of Agricultural Research.* 2017; 51:93-102.
- Niazian, M., Shariatpanahi, M., Abdipour, M. & Oroojloo M. (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.
- Nugent, G., Chandler, S., Whiteman, P. & Stevenson, T. (2001). Somatic Embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 85 – 88.
- Padilla, I., Carmona, E., Westendorp, N. & Encina, C. (2006). Micropropagation and effects of mycorrhiza and soil bacteria on acclimatization and development of lucumo (*Pouteria lucuma* R and Pav.) var. la Molina, *in vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. 42: 193 – 196.
- Quijano, C. & Prieto, Z. (2020). Variabilidad Genética en *Pouteria lucuma* mediante marcadores ISSR. *Manglar* 17(1): 7-12
- Quiroz-Figueroa, F., Fuentes-Cerda, C., Rojas-Herrera, R. & Loyola-Vargas, V. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis system of *Coffea arabica*. *Plant Cell* 20: 1141-1149.



- Roca, A. & Mroginski, F. (1990). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). [http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_en\\_la\\_agricultura.pdf](http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)
- Serrano, M. & Piñol, M. (1991). Biotecnología Vegetal. Editorial Síntesis.
- Silva, J., Montes, S., Acosta, L., Arias, E., & García, A. (2005). Embriogénesis somática: Una alternativa para la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma en cacao. Cuaderno de Biodiversidad Nº 16: 9-12.
- Thrope, T. (1995). *In vitro* somatic embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 557.
- Tripathi, M., Tiwari, S., Tripathi, N., Tiwari, G., Bhatt, D., Vibhute, M., Gupta, N., Mishra, N., Parihar, P., Sing, P., Sharma, A., Ahuja, A. & Tiwari S. (2021). Plant Tissue Culture Techniques for Conservation of Biodiversity of Some Plants Appropriate for Propagation in Degraded and Temperate Areas. In Current Topics in Agricultural Sciences 4: 30-60
- Vengadesan, G. & Pijut, P. (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97: 141-149.
- Vidales-Fernández, R., Slagado-Garciglia, M., Gómez-Lim, E., Ángel-Palomares, B. & Guillén-Andrade, H.. (2003). Embriogénesis Somática de "aguacate" (*Persea americana* Mill. CV. Hass). Actas V Congreso Mundial del Aguacate.
- Wang, W., Zhao, X., & Zhuang, G. (2008). Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:57-67. <file:///C:/Users/JULIO/Downloads/Simplehormonalregulationofhigcienysomaticembryogenesisand.pdf>
- Yahia, M. & Gutiérrez-Orozco, F. (2011). *Lucuma* (*Pouteria lucuma* (Ruiz and Pav) Kuntze). En E. M. Yahia. Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits 3: 443-449. [file:///C:/Users/JULIO/Downloads/Lucuma\\_Pouteria\\_lucuma\\_Ruiz\\_Pav\\_Kuntze.pdf](file:///C:/Users/JULIO/Downloads/Lucuma_Pouteria_lucuma_Ruiz_Pav_Kuntze.pdf)
- Yu, X., Hua, Y., Cheng, Z. & Sheng, X. (2008). Cell Fate Switch during In Vitro plant Organogenesis. *Journal of integrative Plant Biology*, 50 (7): 816-824. [file:///C:/Users/JULIO/Downloads/Cell\\_Fate\\_Switch\\_during\\_in\\_vitro\\_Plant\\_O.pdf](file:///C:/Users/JULIO/Downloads/Cell_Fate_Switch_during_in_vitro_Plant_O.pdf)

