

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER  
EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFFECTO DEL ANA Y TDZ EN LA INDUCCIÓN DE  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE NARANJILLA  
(*Solanum quitoense* L.)**

**Autor: Bach. Raúl Enrique Vargas López  
Asesor: Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé**

**Registro: (.....)**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2023**

# AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



## ANEXO 3-H

### AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

#### 1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Vargas López Raúl Enrique  
DNI N°: 71844907  
Correo electrónico: 7184490777@untrm.edu.pe  
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias  
Escuela Profesional: Ingeniería agroanoma

#### Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): \_\_\_\_\_  
DNI N°: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_  
Facultad: \_\_\_\_\_  
Escuela Profesional: \_\_\_\_\_

#### 2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Efecto del ANA y T0Z en la inducción de embriogénesis somática de garrajilla (Solanum quitoense L.)

#### 3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Miltores Chapané Pablo Eduardo  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 76702744  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0001-7236-6341

#### Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: \_\_\_\_\_  
DNI, Pasaporte, C.E N°: \_\_\_\_\_  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) \_\_\_\_\_

#### 4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

[https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde\\_ford.html](https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html)  
4.00.00 Ciencias agrícolas 4.04.00 Biotecnología agrícola

#### 5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

#### 6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la licencia *creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 20 de enero de 2023

  
Firma del autor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del autor 2

  
Firma del Asesor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Asesor 2

## **DEDICATORIA**

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y mi educación, todo lo que he logrado, se los debo a ellos, por eso les estaré agradecido eternamente. Me inculcaron buenos valores desde mi infancia para formarme como persona de bien en la sociedad, y me apoyan incondicionalmente día a día para cumplir con mis metas.

A mi hermano, por estar siempre a mi lado, apoyándome con sus energías positivas.

## **AGRADECIMIENTO**

A mis padres, por apoyarme y motivarme en esta etapa de mi vida para lograr mis metas y objetivos como estudiante y futuro profesional.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, por ser el centro de estudios superior donde obtuve los conocimientos teóricos y prácticos para formarme como profesional; en especial a la Facultad de Ingeniería y ciencias agrarias (FICA), donde adquirí los conocimientos gracias a los docentes que allí enseñan y me ayudaron en mi formación profesional.

Al Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, lugar donde se llevó a cabo la ejecución de la presente tesis.

A mi asesor, el Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé, quien me apoyo en todo el proceso de ejecución del proyecto, estaré eternamente agradecido por su apoyo.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA  
**RECTOR**

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES  
**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA  
**VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA  
**DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



### ANEXO 3-L

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Efecto del ANA y TDZ en la inducción de embriogénesis somática de tarajilla (Solanum quitoense L.); del egresado Raúl Enrique Vargas López de la Facultad de Ingeniería y Ciencias agrarias Escuela Profesional de Ingeniería agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 30 de enero de 2023



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos'.

Firma y nombre completo del Asesor

Dr. Carlos Eduardo Millones Chanaue

## JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



---

Ing. Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

**PRESIDENTE**



---

Ing. PhD. Ligia Magali García Rosero

**SECRETARIA**



---

Ing. Dr. Jorge Alberto Condori Apfata

**VOCAL**

# CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



## ANEXO 3-Q

### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Efecto del ANA y TDZ en la inducción de embriogénesis somática de Naranjilla (*Solanum quitoense* L.)

presentada por el estudiante ( )/egresado (X) Raúl Enrique Vargas López

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma

con correo electrónico institucional Y184490771@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 21 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual ( ) al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene \_\_\_\_\_ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 03 de marzo del 2023

[Signature]  
SECRETARIO

[Signature]  
PRESIDENTE

[Signature]  
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....  
.....

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-5

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 16 de marzo del año 2023 siendo las 14:00 horas, el aspirante: Raúl Enrique Vargas López, asesorado por Dr. Carlos Eduardo Millanes Charamé defendiendo en sesión pública presencial (X) / a distancia ( ) la Tesis titulada: Efecto del ANA y TDZ en la inducción de embriogénesis somática de Naranjilla (Solanum quitoense L.) para obtener el Título Profesional de Ingeniero agrónomo a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ing. Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Secretario: Ing. PhD Ligia Magali García Rosero

Vocal: Ing. Dr. Jorge Alberto Condori Apata.

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (✓) por Unanimidad (✓) / Mayoría ( ) Desaprobado ( )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 15:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

[Firma]  
SECRETARIO

[Firma]  
VOCAL

[Firma]  
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:  
.....

## ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS .....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS .....	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS .....	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. MATERIAL Y METODOS .....	18
2.1. Lugar de ejecución .....	18
2.2. Material Biológico .....	18
2.3. Procedimientos .....	18
III. RESULTADOS .....	25
IV. DISCUSIÓN.....	32
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES .....	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
ANEXOS .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Arreglo factorial para evaluar la inducción de embriones somáticos (%).....	23
<b>Tabla 2.</b> Diseño experimental del tratamiento .....	24
<b>Tabla 3.</b> Efecto de los tipos de explantes (hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales) de <i>S. quitoense</i> “naranjilla” y reguladores de crecimiento (ANA y TDZ) en la inducción de callo friable, callo compacto, callo embriogénico y raíces adventicias.	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica del área de estudio.....	18
<b>Figura 2.</b> Planta de <i>S. quitoense</i> donadora de frutos.....	19
<b>Figura 3.</b> Acondicionamiento de semillas de <i>S. quitoense</i> para su germinación.....	19
<b>Figura 4.</b> Plántulas de <i>S. quitoense</i> a los 21 días de germinadas <i>in vitro</i> . ....	20
<b>Figura 5.</b> Preparación de medio cultivo de inducción de embriones somáticos de <i>S. quitoense</i> .....	21
<b>Figura 6.</b> Siembra de explantes en medio de cultivo de inducción .....	22
<b>Figura 7.</b> Obtención de explantes y textura de callos inducidos en <i>Solanum quitoense</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Embriones somáticos de <i>S. quitoense</i> . ....	26
<b>Figura 9.</b> Respuesta de los tipos de explantes (hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales) de <i>S. quitoense</i> “naranjilla” y reguladores de crecimiento (ANA y TDZ) en la inducción de callo, raíces adventicias y embriones somáticos.. ....	29
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de embriones somáticos con presencia de plúmula y radícula (Crecimiento y desarrollo).....	30
<b>Figura 11.</b> Emergencia de plúmula y radícula (Crecimiento y desarrollo) de embriones somáticos de <i>S. quitoense</i> .....	31

## RESUMEN

La naranjilla (*Solanum quitoense* L.), solanácea importante de América del Sur, por su fruto tiene potencial para el mercado internacional, no obstante, si las condiciones de cultivo favorecen el desarrollo de determinados microorganismos patógenos, es necesario trabajar para producir variedades resistentes; por tanto, la embriogénesis somática resulta ser instrumento útil en el fitomejoramiento del cultivo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento ANA (ácido naftalenacético), TDZ (Tidiazuron) y fuentes de explantes sobre la inducción de embriogénesis somática de *S. quitoense*. Explantes de hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales de plántulas germinadas in vitro fueron transferidos a medio de cultivo MS adicionado con ANA 5 mg/L, TDZ 0,5 mg/L o su combinación. Todos los explantes de hipocótilos, yemas terminales y hojas cotiledonares desarrollaron callo después de 40 días en el medio de cultivo suplementado ANA y ANA+TDZ. Las hojas cotiledonales cultivadas en medio MS + 0,5 mg/L de TDZ se indujeron masas embriogénicas con embriones en diferentes etapas de desarrollo. Para el crecimiento y desarrollo de embriones somáticos obtenidos, se colocaron en medio MS libre de reguladores de crecimiento o suplementado con ácido giberélico (AG3), 6-furfurilaminopurina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), cuyos embriones lograron desarrollar plúmula y radícula sin registrar diferencias significativas en los tratamientos evaluados. Concluimos que la adición de TDZ al medio de cultivo empleando hojas cotiledonales como explantes, induce la embriogénesis somática. La presente investigación puede utilizarse para tomar medidas que permitan la conservación de especies y experimentos de transformación genética.

**Palabras clave:** Embriogénesis somática, cultivo de tejidos, reguladores del crecimiento vegetal, *Solanum quitoense*, crecimiento y desarrollo

## ABSTRACT

The naranjilla (*Solanum quitoense* L.), an important South American Solanaceae, its fruit has potential for the international market, however, if the growing conditions favor the development of certain pathogenic microorganisms, it is necessary to work to produce resistant varieties; therefore, somatic embryogenesis is a useful tool in crop breeding. The objective of the present study was to evaluate the effect of the growth regulators ANA (naphthaleneacetic acid), TDZ (Thidiazuron) and explant sources on the induction of somatic embryogenesis of *S. quitoense*. Explants from cotyledonal leaves, hypocotyls and terminal buds of in vitro germinated seedlings were transferred to MS culture medium spiked with ANA 5 mg/L, TDZ 0.5 mg/L or their combination. All explants of hypocotyls, terminal buds and cotyledonary leaves developed callus after 40 days on ANA and ANA+TDZ supplemented culture medium. Cotyledonary leaves grown on MS medium + 0.5 mg/L TDZ were induced embryogenic masses with embryos at different stages of development. For the growth and development of somatic embryos obtained, they were placed in MS medium free of growth regulators or supplemented with gibberellic acid (AG3), 6-furfurylaminopurine (KIN), 6-benzylaminopurine (BAP), whose embryos managed to develop plumule and radicle without registering significant differences in the evaluated treatments. We conclude that the addition of TDZ to the culture medium using cotyledonal leaves as explants induces somatic embryogenesis. The present investigation can be used to take measures for species conservation and genetic transformation experiments.

**Key words:** Somatic embryogenesis, tissue culture, plant growth regulators, *Solanum quitoense*, growth and development.

## I. INTRODUCCIÓN

La naranjilla (*Solanum quitoense* L.), es un cultivo importante en América del Sur, considerado el “fruto de oro” de los andes, con potencial para el mercado internacional, por su fruto que es empleado para preparar refrescos, conservas, entre otros (Criollo et al., 2014; Ramírez et al., 2018; Hendrix et al., 1987). Esta especie es endémica de las regiones andinas de Perú, Colombia y Ecuador, países donde se concentra la mayor parte de la producción, mientras que en nuestro país suele cultivarse en los alrededores de las tierras de cultivo, quizás porque no se promueven y difunden ampliamente los beneficios del fruto (Otiniano, 2017; Criollo et al., 2014), sin embargo, países como Ecuador y Colombia emplean el fruto para el procesamiento de néctar y mermelada.

*S. quitoense* pertenece a la familia Solanaceae, donde también se encuentran cultivares como la papa (*S. tuberosum*), el tomate (*S. lycopersicum*), el aguaymanto (*Physalis peruviana*), tomate de árbol (*S. betaceum*) y berenjena (*S. melongena*), cultivares de importancia económica a nivel nacional y mundial (Whalen & Caruso, 1983). En tal sentido, como la mayoría de solanáceas, la naranjilla es muy susceptible al ataque de hongos y bacterias, disminuyendo de esta manera la calidad y rendimiento del fruto (de Jiguina, 2007; Cruz et al., 2019).

La embriogénesis somática ha sido identificada como una excelente herramienta en el fitomejoramiento de los cultivos, lo que no es posible mediante métodos convencionales de mejoramiento genético. Entre esas técnicas destaca la variación somaclonal, la producción de semillas sintéticas, la hibridación somática, mutación de células individuales aisladas y transformación genética (Bhojwani & Dantu, 2013). A través de la embriogénesis somática es fácil poder realizar la transferencia de genes de importancia para el estrés biótico o abiótico. Sin embargo, para aprovechar el poder y el potencial de estas técnicas es fundamental contar con protocolos de regeneración eficientes (Kantharajah & Golegaonkar, 2004; Venkataiah et al., 2016).

La embriogénesis proporciona un sistema modelo para comprender los acontecimientos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se producen durante el desarrollo embrionario de las plantas y la transición de células somáticas a células embriogénicas (Karami et al., 2009). Una de las muchas aplicaciones de la embriogénesis somática es la obtención de genotipos resistentes al estrés abiótico, método basado en la variación

somaclonal inducida en células vegetales cultivadas *in vitro* durante la fase de callogénesis de la embriogénesis somática (Granja et al., 2018; Hannachi et al., 2021).

La regeneración por embriogénesis somática se ha aplicado con éxito en varios cultivos de importancia económica, por ejemplo, *Zea mays* (Lu et al., 1982), *Coffea arabica* (Etienne, 2005; Gatica, Andrés M.; Arrieta, Griselda; Espinoza, 2008), *Theobroma cacao* (Henaó Ramírez et al., 2018), *Musa acuminata* (Remakanthan et al., 2014), entre otras. En la familia Solanaceae, *S. melongena* (Swamynathan et al., 2010), *S. quitoense* (Criollo et al., 2014) y *S. lycopersicum* (Godishala et al., 2011). Sin embargo, en *S. quitoense*, la embriogénesis somática solo ha sido reportado por (Criollo et al., 2014) a partir de hojas cotiledonares e hipocótilos.

Criollo et al. (2014), evaluaron los efectos de diferentes combinaciones de ANA, kinetina y sacarosa en la inducción de la embriogénesis somática en dos cultivares de naranjilla, donde se obtuvo embriones somáticos cuando al medio de inducción estuvo conformado por ANA (5,94 y 9,31 mg/L) y sacarosa (30 y 90 mg/L), para ambos tipos de explantes empleados. Este es el primer informe sobre la obtención de embriones somáticos de esta especie. Sin embargo, se obtuvieron bajos porcentajes de estructuras embrionarias, 50% para el cultivar con espinas y 32% en sin espinas.

El tidiazurón (N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ilurea) o TDZ pertenece al grupo de reguladores del crecimiento de citoquininas, importante regulador del crecimiento que interviene en la mayoría de las fases de crecimiento y desarrollo de las plantas, desarrollo vascular, desarrollo de brotes y raíces, y homeostasis del tejido mitótico, senescencia y más (Feng et al., 2017; Zürcher & Müller, 2016). Se ha reportado que la adición de TDZ favoreció la inducción de embriones somáticos en geranio (Visser et al., 1992), nogal (Neuman et al., 1993), *Vitis vinifera* L. (Matsuta & Hirabayashi, 1989), garbanzo (Murthy et al., 1996), fresa (Fiola et al., 1990), azafrán (*Crocus sativus*) (Sheibani et al., 2007), *Paulownia elongata* (Ipekci & Gozukirmizi, 2003), en plántulas de maní (Saxena et al., 1992) y neem (Murthy et al., 1998), dentro de la familia Solanaceae se reportó en tabaco (Gill et al., 1993) y *Capsicum annuum* (Jayapadma et al., 2008).

Por lo antes indicado se consideró importante realizar esta investigación empleando reguladores de crecimiento y evaluar la embriogénesis somática. El desarrollo de protocolos de embriogénesis somática es importante, ya que permite evaluar *in vitro*

genotipos derivados de embriones somáticos para determinar su resistencia a agentes bióticos y abióticos.

En tal sentido, se plantearon los siguientes objetivos:

**Objetivo General:**

1. Evaluar el efecto del ácido naftalenacético (ANA) y Thidiazuron (TDZ) en la inducción de embriogénesis somática en naranjilla (*S. quitoense*).

**Objetivos específicos:**

1. Determinar las dosis adecuadas del ácido naftalenacético (ANA) y Thidiazuron (TDZ) para la inducción de embriogénesis somática de naranjilla (*S. quitoense*).
2. Evaluar reguladores de crecimiento en el crecimiento y desarrollo de embriones somáticos inducidos de naranjilla (*S. quitoense*).

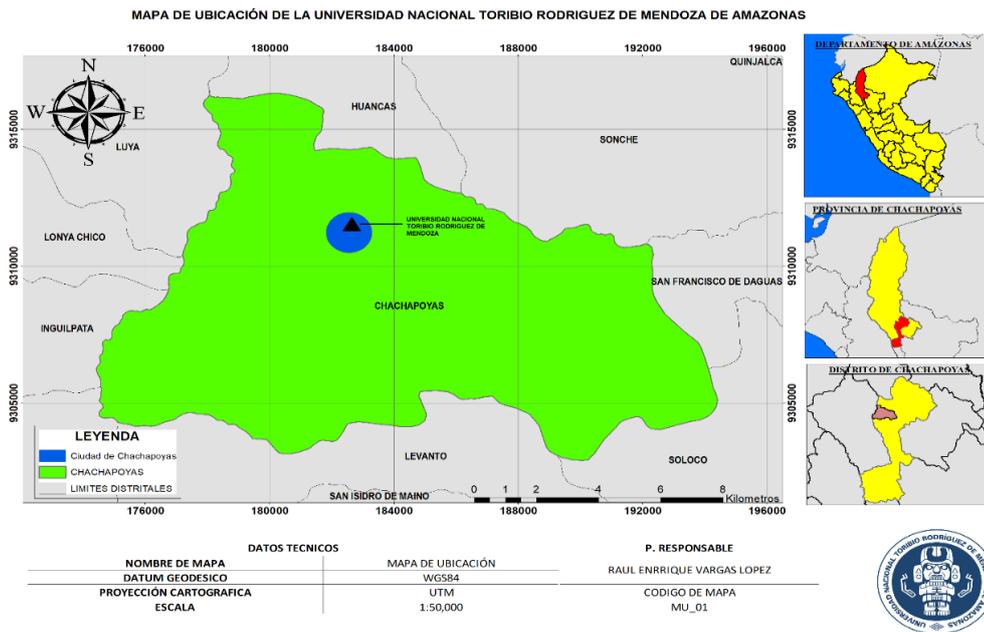
## II. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), ubicado en el distrito de Chachapoyas, región Amazonas, en el norte del Perú (Figura 1).

**Figura 1**

*Ubicación geográfica del área de estudio*



### 2.2. Material Biológico

Frutos de *S. quitoense* en madurez fisiológica y con adecuado aspecto fitosanitario.

### 2.3. Procedimientos

#### a. Recolección del material vegetal

Frutos en madurez fisiológica (Figura 2) y con adecuado aspecto fitosanitario de *S. quitoense* fueron colectados el 14 de noviembre del 2021 en el Anexo Beirut, distrito Corosha, provincia Bongará, región Amazonas.

#### b. Pretratamiento de las semillas

Los frutos de *S. quitoense* en madurez fisiológica fueron cortados y fermentados por un periodo de 48 horas, luego se extrajeron las semillas de los frutos y se lavaron con abundante agua hasta eliminar por completo el mucílago adherido, y finalmente se orearon por un periodo de 72 horas (Figura 3).

## Figura 2

*Planta madre de naranjilla (S. quitoense) donadora de frutos.*



Previo a la germinación de las semillas in vitro, estas fueron sumergidas en agua corriente por un periodo de 12 horas con la finalidad de facilitar la imbibición y eliminación de algunos inhibidores de la germinación.

## Figura 3

*Acondicionamiento de las semillas de S. quitoense para su germinación in vitro.*

*a. Frutos en madurez fisiológica. b. Frutos en fermentación. c. Semillas con el mucílago retirado.*

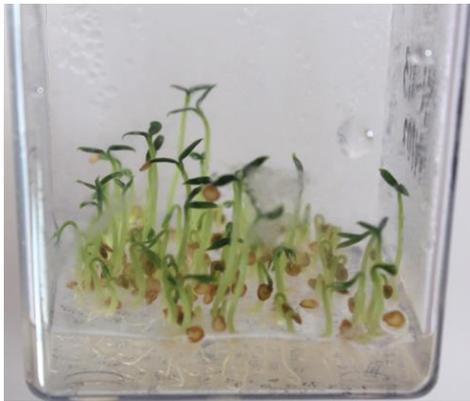


### c. Desinfección y germinación de semillas de *S. quitoense in vitro*

Las semillas acondicionadas en la etapa anterior fueron desinfectadas en cámara de flujo laminar, sumergiendo las semillas por 1 minuto en alcohol 70%, se enjuagó con agua destilada estéril y se sumergió en lejía al 10% (NaCl 0,4%) + 2 gotas de tween 20° por 15 minutos y se enjuagó 3 a 4 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron las semillas en magentas con medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) suplementado con vitaminas, 30 g/L de sacarosa y 0,15% (p/v) de phytigel, se rotuló las magentas y se selló con Plastic wrap. Las semillas germinaron en su totalidad a los 21 días de cultivo *in vitro* (Figura 4).

#### **Figura 4**

*Plántulas de S. quitoense a los 21 días de germinadas in vitro.*



### d. Etapa 1. Inducción de embriones somáticos

#### **Preparación de medio de cultivo**

Se empleó un medio de cultivo semisólido, constituido por 4,43 g/L de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de vitaminas, 60 g/L de sacarosa, 2,0 g/L de mio-inositol y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, según los niveles del factor B del diseño experimental empleado (Tabla 1), seguidamente se ajustó el pH a 5,8 con NaOH 1N o HCl 1N, se añadió Phytigel al 0,15% (p/v) y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos a 1,2 Bar de presión (Figura 5).

## Figura 5

*Preparación de medio cultivo de inducción de embriones somáticos de S. quitoense. a. Peso de los insumos empleados para el medio de cultivo. b. Calibración de pH del medio de cultivo a 5.8. c. Dilución del phytigel en el medio de cultivo. d. Colocación de medio de cultivo en los recipientes. e. Empaque de los recipientes con el medio de cultivo para esterilizar.*

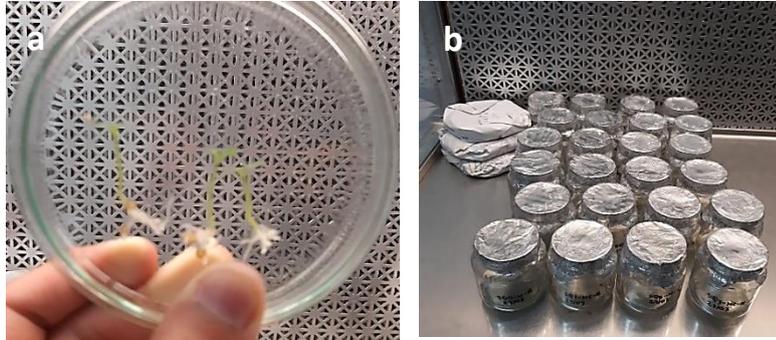


## Siembra de explantes en medio de inducción

Los explantes hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales fueron obtenidos a partir de plántulas de 21 días después de la germinación *in vitro* (Figura 6). En la siembra en medio de inducción, para el explante hojas cotiledonales se colocó la parte adaxial en contacto con el medio de cultivo y los hipocótilos fueron cortados en segmentos de 1 a 2 cm. Los explantes ya segmentados se sembraron en frascos Gerber con 15 mL de medio de cultivo de inducción.

## Figura 6

*Siembra de explantes en medio de cultivo de inducción. a. Plántulas de 21 días de germinadas in vitro. b. Explantes colocados en medio de cultivo en los frascos Gerber.*



### Condiciones de cultivo

Todos los tratamientos se mantuvieron en estufa en condiciones de oscuridad total a  $28 \pm 1$  °C durante 40 días.

### VARIABLES EVALUADAS

#### *Porcentaje de inducción de embriones somáticos*

Se calculó al dividir el número de embriones somáticos entre el total de explantes del recipiente Gerber multiplicado por 100.

### Diseño de la investigación

Para evaluar la respuesta de los explantes de *S. quitoense* a las diferentes concentraciones de ANA y TDZ se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial 3Ax4B. Los factores y niveles se distribuyeron de la siguiente manera: Factor A (Tipo de explante) con 3 niveles (Hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales) y factor B (Reguladores de crecimiento) con 4 niveles (Sin reguladores de crecimiento, ANA 5,0 mg/L, TDZ 0,50 mg/L y ANA 5,0 mg/L + TDZ 0,50 mg/L). Se evaluaron 12 tratamientos con 5 repeticiones (Tabla 1), haciendo un total de 60 unidades experimentales. La unidad experimental (UE) fue diferente para cada tipo de explante: Hojas cotiledonares: 6 explantes por UE. Hipocótilos: 6 explantes por UE. Yemas terminales: 3 explantes por UE.

**Tabla 1***Arreglo factorial para evaluar la inducción de embriones somáticos (%)*

<b>Factores</b>	<b>Interacciones</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>Factor A: Tipo de explante</b>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	T1
A <sub>1</sub> : Hojas cotiledonales	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	T2
A <sub>2</sub> : Hipocótilos	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	T3
A <sub>3</sub> : Yemas terminales	A <sub>1</sub> B <sub>4</sub>	T4
<b>Factor B: Reguladores de crecimiento</b>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	T5
B1: Sin reguladores de crecimiento	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	T6
B2: ANA 5,0 mg/L	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	T7
B3: TDZ 0,50 mg/L	A <sub>2</sub> B <sub>4</sub>	T8
B4: ANA 5,0 mg/L + TDZ 0,50 mg/L	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	T9
	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	T10
	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	T11
	A <sub>3</sub> B <sub>4</sub>	T12

**e. Etapa 2. Crecimiento y desarrollo de embriones somáticos****Preparación de medio de cultivo de crecimiento y desarrollo de embriones somáticos**

Se empleó un medio de cultivo semisólido, conformado por los macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) al 100%, suplementado con tiamina 0,5 mg/L, glicina 2,0 mg/L, ácido nicotínico 0,5 mg/L, piridoxina 0,5 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, sacarosa al 2,5% (p/v) y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, según tratamiento (Tabla 2), seguidamente se ajustó el pH a 5,8 con NaOH 1N o HCl 1N antes de su esterilización y se añadió Phytigel al 0,15% (p/v). Para cada recipiente tubo de ensayo se empleó 15 mL de medio de cultivo, se cubrieron con papel de aluminio, se etiquetaron y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min a 1,2 bar de presión.

**Siembra en medio de crecimiento y desarrollo de embriones**

Utilizando una cámara de flujo laminar y un estereoscopio, se identificaron embriones somáticos en distintas fases (globular, corazón, torpedo y cotiledonar). Estos últimos fueron sustraídos de la masa embriogénica y sembrado en medio de

crecimiento y desarrollo. Se sembró dos embriones por tubo de ensayo, posteriormente se sellaron los recipientes con plastic cling wrap.

### **Condiciones de cultivo**

Todos los tratamientos se incubaron en una sala de crecimiento a  $24 \pm 1$  ° C bajo una luz fluorescente blanca con un fotoperiodo luz/oscuridad de 16:8h.

### **VARIABLES EVALUADAS**

#### ***Porcentaje de embriones somáticos que poseen plúmula y radícula***

Se calculó dividiendo el número de embriones somáticos que posean plúmula y radícula por el número total de embriones y multiplicado por 100.

### **Diseño de la investigación**

Para esta etapa, se empleó un diseño completamente al azar (DCA) de 4 tratamientos y 10 repeticiones. Se distribuyeron 2 embriones en tubos de ensayo, siendo este último la unidad experimental. Dando un total de 40 tubos de ensayo y 80 embriones. A continuación, se muestra como estuvo conformado:

### **Tabla 2**

*Reguladores de crecimiento empleados en el crecimiento y desarrollo de embriones somáticos*

<b>Tratamiento</b>	<b>Regulador de crecimiento (mg/L)</b>
T1	Control (sin reguladores de crecimiento)
T2	AG <sub>3</sub> 0,1 mg/L
T3	AG <sub>3</sub> 0,1 mg/L + KIN 0,05 mg/L
T4	AG <sub>3</sub> 0,1 mg/L + BAP 0,05 mg/L

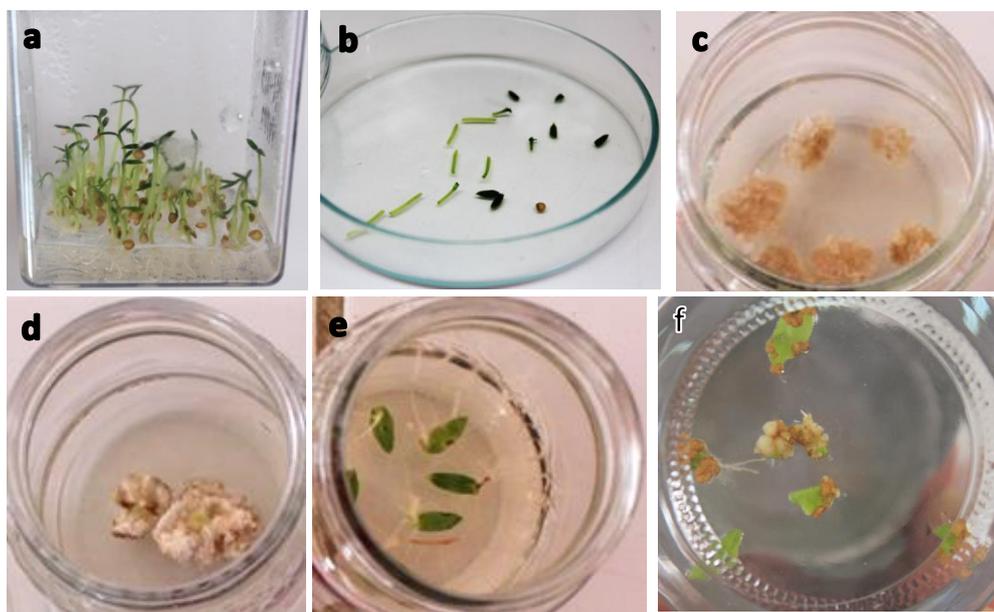
### III. RESULTADOS

#### 3.1. Determinación de las dosis adecuadas del ácido naftalenacético (ANA) y Tidiazurón (TDZ) en la inducción de embriogénesis somática de naranjilla (*S. quitoense* L.)

Se estudió la inducción de embriones somáticos a partir de explantes de hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales en medio MS suplementado con diferentes dosis de reguladores de crecimiento en *S. quitoense*. La respuesta del tipo de explante y los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo de inducción fue diferente en los tratamientos evaluados, registrando callo friable, callo compacto, callo embriogénico y raíces adventicias (Figura 7c, d, e y f). La respuesta en embriones somáticos, solo se registró cuando se empleó en el medio de cultivo la citoquinina TDZ 0,5 mg/L y como explante las hojas cotiledonales (Tabla 3). En tanto, la respuesta organogénica (raíces adventicias) se registró principalmente cuando no se empleó reguladores de crecimiento. Por último, se observaron callos embriogénicos sin diferenciación a embrión somático cuando se empleó solo ANA (hipocótilo/ANA), solo TDZ (hipocótilo/TDZ, yema terminal/TDZ) o la combinación ANA + TDZ (en hoja cotiledonal/ANA + TDZ) (Tabla 3).

#### Figura 7

*Obtención de explantes y textura de callos inducidos en Solanum quitoense. a) Plántulas de S. quitoense germinadas in vitro, b) preparación de explantes para su colocación en medios de inducción., c) callo friable, d) callo compacto, e) raíces adventicias y f) callo embriogénico.*

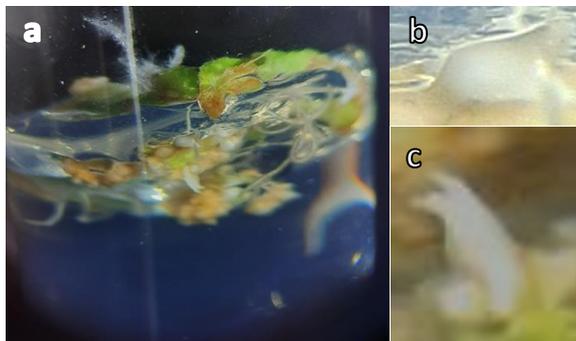


### **Inducción de embriogénesis somática a partir de hojas cotiledonales**

Embriones somáticos fueron inducidos a partir de hojas cotiledonales, empleando medio MS suplementado con 0,5 mg/L de TDZ. En el experimento desarrollado, solo 48 % de los callos embriogénicos obtenidos, formaron embriones somáticos (Tabla 3). La iniciación del callo se observó a los 21 días de cultivo *in vitro*, observándose una masa embriogénica a partir de la cual a los 40 días de cultivo inició la diferenciación de los embriones somáticos (Figura 7f). El número de embriones fueron contabilizados en la sexta semana de cultivo *in vitro*, registrando una media de 4,1 embriones somático por explante. Los embriones individuales se convirtieron en estructuras bipolares distintas y pasaron por cada uno de los estadios de desarrollo típicos: globular (figura 8b), corazón, torpedo (figura 8c) y cotiledonar tras 5-6 semanas de cultivo. El desarrollo de los embriones somáticos fue asíncrono, como resultado, se pudieron observar varias etapas de desarrollo embrionario en el mismo grupo de embriones originados a partir de los explantes.

#### **Figura 8**

*Embriones somáticos de S. quitoense. a) masas de callo embriogénico, b) forma globular y c) forma de torpedo.*



Por otra parte, las hojas cotiledonales tuvieron diferente respuesta en los otros medios evaluados. En el medio MS suplementado con 5,0 mg/L de ANA se observó un 90% de callo friable en todos los explantes evaluados, el callo mostró un crecimiento desorganizado de células de color crema, un 73,3% de estos callos presentaron raíces adventicias (organogénesis). En el medio MS suplementado con 5,0 mg/L de ANA + 0,50 mg/L TDZ, a las 3 semanas se observó callo friable de color café que con el pasar de las semanas tomó aspecto de masas embriogénicas (93,3%), pero no llegaron a diferenciarse en embriones somáticos. En el medio MS sin reguladores de crecimiento, las hojas cotiledonales solo formaron raíces adventicias en un 63,3% de explantes, las raíces emergieron de la vena principal del corte de la hoja (Figura 7e).

### Inducción de raíces adventicias y callo a partir de hipocótilos

La formación de callo empezó a partir de la tercera semana de cultivo en todos los medios empleados (Tabla 1). En general los callos eran medianos a pequeños (de 0,5 a 1 cm de diámetro) y de color blanco cremoso, a excepción de los callos formados en los medios + 5,0 mg/L de ANA + 0,50 mg/L TDZ (Tabla 1), los cuales eran grandes (3 cm de diámetro) y amarillentos. En este medio se obtuvo un 100% de explantes con callo friable. En los medios suplementados con 5,0 mg/L de ANA, se obtuvo callo embriogénico de color blanco brillante en un 60% y 36,7% de callo friable. El empleo de 0,5 mg/L de TDZ se obtuvo 76,7% de callo embriogénico en los explantes evaluados, ambos tipos de callos no llegaron a diferenciarse en embriones somáticos. Aunque los callos cultivados en este medio mostraban signos de zonas embriogénicas, no crecieron y pronto se volvieron marrones. En los medios de cultivo sin reguladores de crecimiento los hipocótilos presentaron raíces adventicias en un 40% de explantes.

**Tabla 3**

*Efecto de los tipos de explantes (hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales) de S. quitoense y reguladores de crecimiento (ANA y TDZ) en la inducción de callo friable, callo compacto, callo embriogénico y raíces adventicias.*

Tipo de explante / Regulador de crecimiento	Inducción (%)				
	Callo friable	Callo compacto	Callo embriogénico	Callo embriogénico (sin diferenciación en embrión somático)	Raíces adventicias
HC-SRC	---	---	---	---	63,3
HC-ANA	90,0 <sup>b</sup>	---	---	---	---
HC-TDZ	---	---	48,0	---	---
HC-ANA+TDZ	---	---	---	93,3	---
HI-SRC	---	---	---	---	40,0
HI-ANA	36,7	---	---	60,0	---
HI-TDZ	---	---	---	76,7	---
HI-ANA+TDZ	100,0	---	---	---	---
YT-SRC	---	---	---	---	73,3
YT-ANA	86,7 <sup>a</sup>	---	---	---	---
YT-TDZ	---	---	---	30,0	---
YT-ANA+TDZ	33,3	46,7	---	---	6,7

HC= Hoja cotiledonal, HI= Hipocótilo, YT= Yema terminal, SRC= Sin reguladores de crecimiento.

<sup>a</sup>: 33,3% de callos friables indujeron raíces adventicias.

<sup>b</sup>: 73,3% de callos friables indujeron raíces adventicias.

### **Inducción de raíces adventicias y callo a partir de yemas terminales**

En la Tabla 3, todos los tratamientos formaron callo, excepto el tratamiento sin reguladores de crecimiento; el tratamiento con 5,0 mg/L de ANA obtuvo un 86,7% de callo friable, de los cuales 33,3% indujeron raíces adventicias (organogénesis), el tratamiento con 0,50 mg/L de TDZ obtuvo un 30,0% de callo embriogénico de color crema medio café, sin embargo, no llegó a producir embriones. El tratamiento suplementado con 5,0 mg/L de ANA + 0,50 mg/L TDZ registró tres diferentes respuestas así tenemos: 33,3% de callo friable de color crema medio blanco, 46,7% de callo compacto y 6,7% de explantes con raíces adventicias.

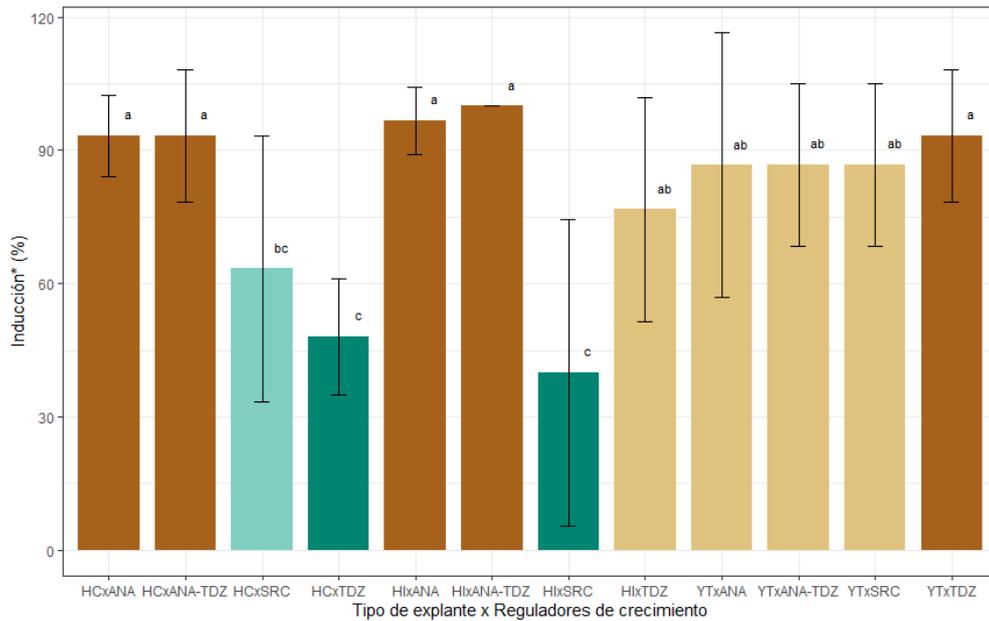
### **Respuesta de tipos de explantes y reguladores de crecimiento en *S. quitoense***

Las respuestas de la interacción de los efectos del tipo de explante (hoja cotiledonal, hipocótilo y yema terminal) de *S. quitoense* y los reguladores de crecimiento (ANA y TDZ) mostraron diferente respuesta de inducción (callo friable, callo embriogénico con o sin diferenciación en embrión somático) (figura 9). Un primer grupo estuvo conformado por la interacción de los factores YT\*ANA, YT\*ANA-TDZ, YT\*SRC, YT\*TDZ, HC\*ANA, HC\*ANA-TDZ, HI\*ANA y HI\*ANA-TDZ, respectivamente. Un segundo grupo por la interacción HC\*SRC con un porcentaje de inducción de callo embriogénico en 63,3%, sin diferenciación en embrión somático. Finalmente, el tercer grupo por las interacciones HI\*SRC y HC\*TDZ con inducción de 40% y 48% respectivamente. En este grupo la interacción HC\*TDZ fue la única cuyos callos embriogénicos se diferenciaron en embriones (Figura 7f, 11a).

### Figura 9

Respuesta de los tipos de explantes (hojas cotiledonales, hipocótilos y yemas terminales) de *S. quitoense* “naranjilla” y reguladores de crecimiento (ANA y TDZ) en la inducción de callo, raíces adventicias y embriones somáticos. Datos presentados con medias  $\pm$  desviación standard, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un  $P \leq 0.05$  de acuerdo con la prueba Tukey.

\* Diferente respuesta de inducción.



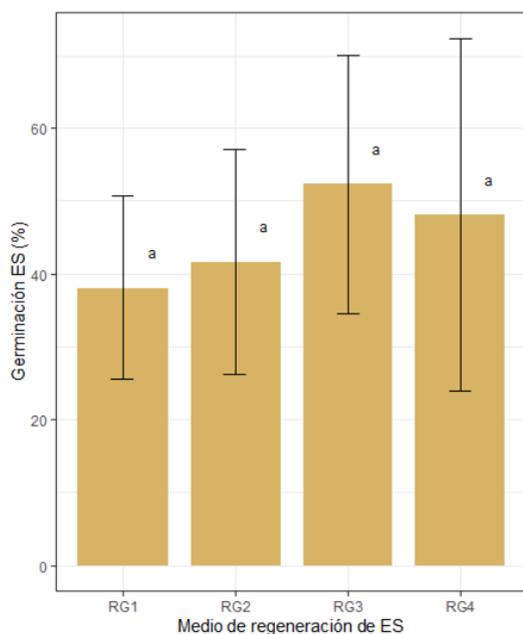
### 3.2. Evaluación reguladores de crecimiento en el crecimiento y desarrollo de embriones somáticos

Los embriones somáticos obtenidos de hojas cotiledonales, para el desarrollo y crecimiento de plúmula y radícula se colocaron en cuatro medios de cultivo, consistentes en medio MS sin reguladores de crecimiento, medio MS adicionado de 0,1 mg/L de AG<sub>3</sub>, medio MS adicionado de 0,1 mg/L de AG<sub>3</sub> + 0,05 mg/L de KIN, y medio MS adicionado de 0,1 mg/L de AG<sub>3</sub> + 0,05 mg/L de BAP (Tabla 2).

Como se muestra en la Figura 10, todos los reguladores de crecimiento evaluados en la etapa de desarrollo y crecimiento de plúmula y radícula de embriones fueron estadísticamente similares.

### Figura 10

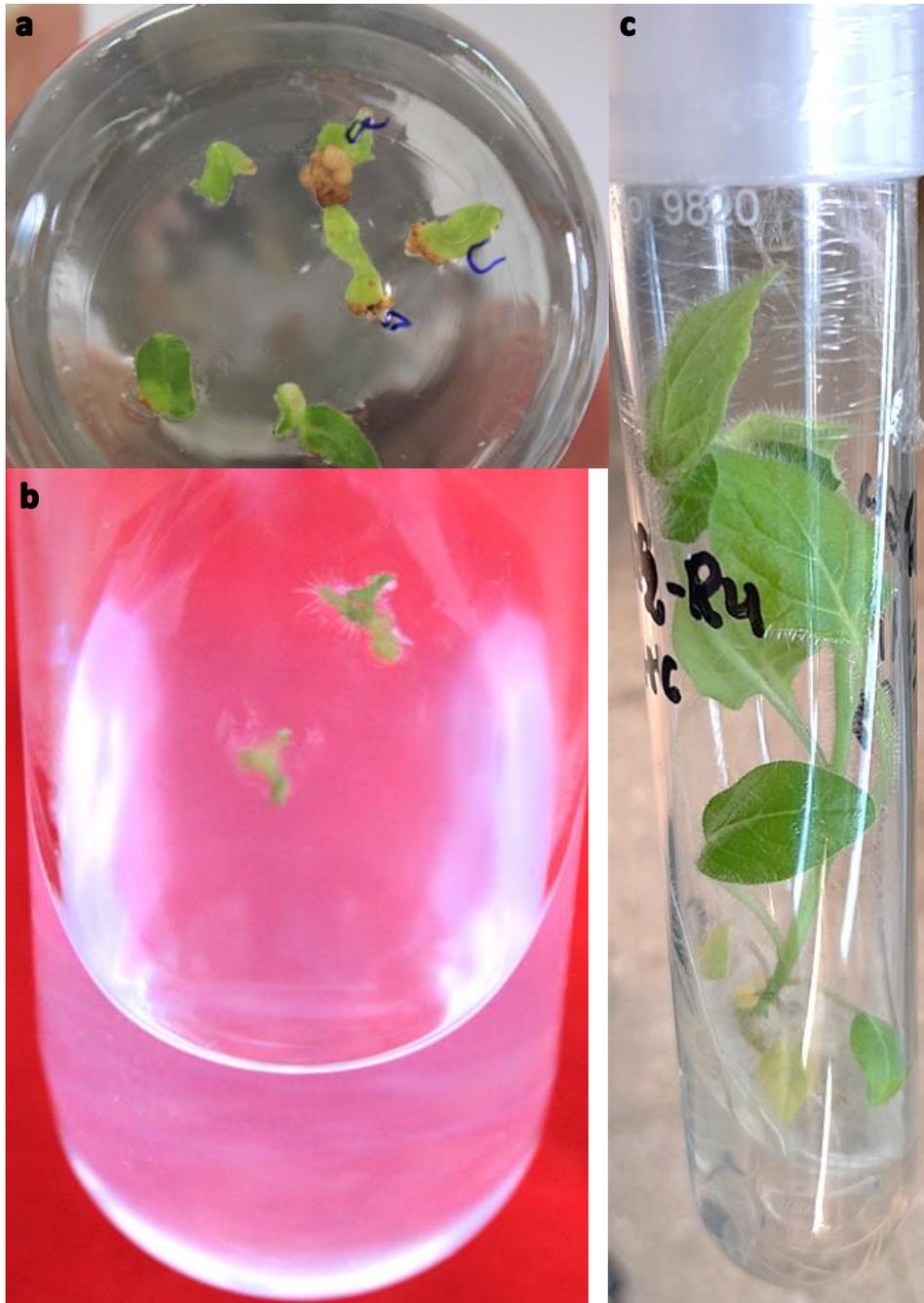
Porcentaje de embriones somáticos con presencia de plúmula y radícula (Crecimiento y desarrollo). Datos presentados con medias  $\pm$  desviación standard, letras iguales indican diferencias no significativas en los parámetros evaluados para un  $P \leq 0.05$  de acuerdo con la prueba Tukey.



Las masas embriogénicas formadas a los 21 días de cultivo *in vitro* (Figura 11a), a partir de las cuales los embriones somáticos se diferenciaron a los 41 días de cultivo *in vitro* (Figura 11b), los cuales, al ser colocados en medios de cultivo de desarrollo y crecimiento, maduraron hasta formar una plántula completa (Figura 11c).

**Figura 11**

*Emergencia de plúmula y radícula (Crecimiento y desarrollo) de embriones somáticos de S. quitoense. a) masas de callo embriogénico, b) crecimiento y desarrollo de embriones somáticos y c) crecimiento y desarrollo de la plántula.*



## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Inducción de embriogénesis somática

La embriogénesis es un modo específico de desarrollo en el que un óvulo fecundado forma un embrión a través de una serie de patrones predeterminados de división y diferenciación celular (Collinet & Lecuit, 2021), descubierto por primera vez hace cuatro décadas (Venkatachalam et al., 2003) y que se ha aplicado con éxito a más de trescientas especies de plantas diferentes, desde plantas herbáceas anuales y perennes hasta árboles (Bajaj, 1995).

Se han observado dos vías de embriogénesis: la vía directa, en la que los embriones se forman directamente a partir del explante sin formación previa de callo, produciendo normalmente pequeñas cantidades de embriones somáticos, y la vía indirecta, en la que se produce la formación de callo y el medio se sustituye a continuación por un medio inductor de embriogénesis somática para producir embriones somáticos (Grout, 2016; Merkle et al., 1995). En la presente investigación se observó embriogénesis directa, dado que a partir de los explantes cotiledonales, se formaron masas embriogénicas y a partir de estas se formaron los embriones somáticos.

En la literatura disponible, se sabe que el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) se utiliza para el cultivo de tejidos *in vitro* de *S. quitoense* y entre los reguladores del crecimiento, se utilizan ANA y KIN (Criollo et al., 2014). Por otra parte, en una amplia variedad de especies que producen cultivos embriogénicos, se han utilizado auxinas, concretamente 2,4-D y ANA, solas o en combinación con citoquininas, en la inducción y proliferación de embriones (Lakshmanan & Taji, 2000).

Como resultado de nuestros experimentos, se identificó que la adición de TDZ al medio de cultivo estimuló la inducción de la embriogénesis somática, se evaluó tres tipos de explante, hojas cotiledonares, hipocótilos y yemas terminales; las hojas cotiledonares fueron los únicos explantes que lograron la formación de embriones, esto se sustenta con lo dicho por Lakshmanan & Taji (2000), donde los cultivos embriogénicos se inician mayoritariamente a partir de tejido joven o inmaduro, los explantes más eficaces utilizados para la inducción de cultivos embriogénicos son embriones cigóticos inmaduros, cotiledones, ejes, folíolos inmaduros, entre otros.

Sin embargo, se desconoce si las concentraciones de TDZ aumentan o disminuyen la inducción de embriones somáticos. Los embriones somáticos se desarrollaron por primera vez después de 40 días en medio nutritivo MS con 0,50 mg/L de TDZ añadido y fueron visualmente detectables tras la transferencia de los explantes al medio nutritivo, mostraron plúmula y radícula a los 40 días. Todas las fases o estadios de los embriones somáticos, desde globular a embrión cotiledonar, se desarrollaron en la base de los explantes de hoja cotiledonar, en la herida producida por el corte del explante. Los medios de inducción que contenían ANA y TDZ o solamente ANA, no fueron muy adecuados para la inducción de embriones o no pudieron estimular alguna respuesta embriogénica, pero se observó raíces adventicias en el explante, hasta posiblemente masas embriogénicas, sin embargo, no lograron diferenciarse en embriones somáticos, pues los medios no fueron muy adecuados para la inducción de embriones o la diferenciación hacia un embrión somático. Durante el proceso de diferenciación celular, las células responden a estímulos endógenos que desencadenan respuestas de señalización y modifican así el programa génico de la célula (Méndez-Hernández et al., 2019).

De los cuatro medios probados utilizando ANA y TDZ, el medio que contenía 0,50 mg/L de TDZ resultó ser el óptimo para la inducción de la embriogénesis somática. La naturaleza de los reguladores del crecimiento, su concentración y las combinaciones utilizadas en los medios nutritivos desempeñan un papel importante en la embriogénesis somática. El tipo de auxina o de auxina en combinación con citoquinina utilizado en el medio de inducción puede tener un efecto significativo en la tasa de crecimiento de los embriones somáticos (Sharada et al., 2019).

Resultados similares obtuvieron Sheibani et al., (2007), en plántulas de azafrán (*Crocus sativus*) cultivadas en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones (0, 0,1, 0,25 y 0,5 mg/L) de TDZ, encontrando que el tratamiento de 0,5 mg/L el que mejor indujo embriones somáticos, estos últimos aparecieron tras dos meses de cultivo empleando cormos como explante, además el autor menciona que se dio una embriogénesis directa y el porcentaje de explantes con respuesta de inducción de embriogénesis aumentó con el incremento de las concentraciones de TDZ, por lo que podría ser posible una mayor inducción utilizando concentraciones más altas de TDZ. En nuestra investigación, como se mencionó anteriormente solo se evaluó una dosis de TDZ, por lo cual sería importante evaluar más dosis de TDZ para evaluar si

aumenta o disminuye el porcentaje de inducción de embriones somáticos de *S. quitoense*

En *Paulownia elongata*, Ipekci & Gozukirmizi (2003), utilizando diferentes concentraciones de TDZ (8, 10, 15 y 20 mg/L) observaron la inducción de embriones somáticos empleando 10 mg/L de TDZ a partir de explantes foliares (69,8%) y entrenudos (58,5%) en medio MS después de 7 días, se observó que al aumentar la dosis de TDZ el porcentaje de inducción de embriones se reducía, los otros medios también indujeron embriones somáticos pero en menor porcentaje y en todos los medios se produjo embriogénesis somática directa. En nuestro experimento también se dio embriogénesis directa. Se ha demostrado que la TDZ no sólo sustituye el requisito de auxina-citoquinina para el proceso de inducción, sino que también aumenta el número de embriones somáticos, y la variación de la dosis puede mejorar la respuesta embriogénica de los explantes (Gill & Saxena, 1993; Visser et al., 1992). En nuestra investigación se obtuvo una media de 4,1 embriones por explante, la adición de una dosis mayor de TDZ podría aumentar el número de embriones, así como reducir el tiempo de inducción.

Recientemente, Amirova et al. (2022), en *Paulownia tomentosa* utilizando como explantes hojas, descubrieron que la adición de TDZ (1,0 mg/L) y ANA (0,5 mg/L) al medio de cultivo, estimulaban la tasa de inducción de embriogénesis somática, se observó que al aumentar la dosis de TDZ en el medio de cultivo, induce una disminución del potencial regenerativo de los callos, esto se corrobora con lo mencionado por Ipekci & Gozukirmizi (2003) y Joshi et al. (2008), donde mencionan que al aumentar la dosis de TDZ disminuye la respuesta embriogénica del explante, además se informó de la pérdida de capacidad morfogénica durante la embriogénesis somática, las masas embriogénicas de *A. hypogaea* respondieron menos a la diferenciación a altas concentraciones de TDZ (3,0 – 10,0 mg/L) y varias de estas estructuras se desdiferenciaron y se volvieron necróticas (Joshi et al., 2008). Por otra parte, el empleo de TDZ en *Paulownia tomentosa* indujo embriogénesis somática indirecta. Lo último no se relaciona con nuestra investigación, donde la adición de 0,50 mg/L de TDZ en explantes cotiledonares de *S. quitoense* indujo directamente embriones somáticos.

Por otra parte, en Jojoba (*Simmondsia chinensis*), El-Ashry et al. (2017) emplearon dos medios de cultivo simultáneos para la inducción de embriones somáticos, empleando explantes de tallo y hojas, el primer medio para inducción de callo y el segundo para inducir embriones somáticos, los autores reportaron que el mayor porcentaje de callos embriogénicos derivados de explantes de tallo se registró utilizando 1,0 o 4,0 mg/L de medio que contenía TDZ. En general, los embriones somáticos se inducen cuando los cultivos se exponen inicialmente a un medio que contiene dosis más altas de auxinas, seguido de una transferencia posterior a un medio suplementado con dosis más bajas de auxinas o niveles óptimos de citoquininas (Fujimura & Komamine, 1979; Thorpe, 1993). Caso contrario ocurrió en nuestra investigación, donde solo se usó un medio de cultivo suplementado con citoquininas y no fue necesario subcultivos para la obtención de embriones somáticos, se ha encontrado que el TDZ solo sustituye tanto a la auxina como a la citoquinina como prerrequisito para una embriogénesis sustancial en numerosas especies (Ahmad & Faisal, 2018).

En *Metabriggsia ovalifolia*, una especie en peligro de extinción, Ouyang et al. (2016), emplearon TDZ para inducir embriones somáticos y organogénesis. Empleando dosis bajas entre 0,22 – 0,55 mg/L de TDZ se logró inducir organogénesis a partir de la quinta semana de cultivo y empleando dosis de 1,1 – 5,5 mg/L de TDZ se formaron fácilmente embriones somáticos en los explantes de hoja, aumentando la frecuencia de embriogénesis somática. Estos resultados se relacionan con los artículos antes descritos, a mayor dosis de TDZ se incrementa la respuesta embriogénica. Así mismo, el autor menciona que en caso de *Metabriggsia ovalifolia*, elevadas dosis de TDZ, también inhiben el desarrollo y crecimiento de embriones, pueden matar los tejidos vegetales y causar aberraciones en el desarrollo. Esto puede justificar la emergencia de plúmula y radícula por debajo del 50% en nuestra investigación. La muerte de tejidos es descrito por Visser et al. (1992), donde hipocótilos de geranio (*Pelargonium x hortorum*), empleando TDZ dio origen a embriones somáticos, sin embargo, cuando empleo dosis de TDZ superiores a 1,1 mg/L los explantes se necrosaron. Así mismo, embriones somáticos de *Oncidium sp.* inducidos por TDZ no se desarrollaron en plántulas, sino en estructuras anormales verdes que finalmente se volvieron marrones y se deterioraron al cabo de 2 meses de cultivo (Chen & Chang, 2000). Por otra parte, Mithila et al. (2003), indujeron

organogénesis empleando 0,55 mg/L de TDZ y al aumentar la dosis en un rango de 1,10 – 2,20 mg/L de TDZ indujo embriogénesis somática a partir de explantes foliares y pecíolos en plantas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). Los factores que afectan a la embriogénesis somática son el tipo de explante y el genotipo, mientras que determinadas concentraciones de reguladores del crecimiento pueden funcionar en algunas especies, pero causar mortalidad en otras, como *Pelargonium x hortorum* y *Saintpaulia ionantha*.

El TDZ se utilizó por primera vez para cosechar mecánicamente el algodón y recientemente se ha incorporado a los medios de cultivo de tejidos como herramienta para promover la morfogénesis, actuando como sustituto de las auxinas y citoquininas necesarias para el cultivo de tejidos, la organogénesis y la embriogénesis somática en diversas especies (Huetteman & Preece, 1993).

En el presente estudio, los embriones somáticos se originaron a partir de las células de las hojas cotiledonares adyacentes al callo que se formó en el extremo cortado del explante. Los embriones se presentaron en grupos o racimos. Solo se observaron embriones somáticos en el extremo cortado, es decir, fue necesario una herida en el tejido para iniciar el callo y posteriormente la embriogénesis, lo cual concuerda con Gill & Saxena (1993), donde los bordes heridos de los explantes foliares de *Nicotiana tabacum* suplementados con diferentes dosis (0,05 – 3,30 mg/L) de TDZ se volvieron gruesos en comparación con la región central. En hipocótilo ocurrió algo similar, el callo inicio en los extremos cortados del explante, en algunos tratamientos se logró observar callo embriogénico mas no formaron o se diferenciaron en embriones somáticos. En yemas terminales el callo empezó a formarse en la base del explante, y conforme los días fueron pasando el meristemo comenzó a elongarse y las hojas jóvenes que entraron en contacto con el medio de cultivo formaron callos embriogénicos y embriones somáticos (Datos no mostrados), se observaron embriones en sus diferentes etapas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar), se empleó 0,50 mg/L de TDZ

Entre otras especies de plantas, por ejemplo en geranio, Haensch (2004), indujo la embriogénesis somática y organogénesis en cultivos de peciolo de dos cultivares de *Pelargonium x hortorum* y de un cultivar de *Pelargonium x domesticum* usando tidiazuron (TDZ) en dosis de 0,22, 1,10 y 2,20 mg/L. La regeneración aumentó

ligeramente con concentraciones más bajas de TDZ, relacionándose con lo antes mencionado por Ouyang et al. (2016), donde dosis elevadas de TDZ disminuyen el crecimiento y desarrollo de embriones. En *Rosa chinensis* la suplementación de bajas dosis de TDZ aumentó la frecuencia de inducción de callos embriogénicos y la producción de embriones, sin embargo, mostraron una morfología anormal y se volvieron marrones cuando se aplicó TDZ a 2,47 mg/L (Chen et al., 2014).

En el proceso de embriogénesis somática en *Pelargonium × hortorum*, los hipocótilos tratados con 2,20 mg/L de TDZ produjeron niveles elevados de etileno en 6 h en la cabeza de los recipientes de cultivo (Hutchinson et al., 1997). El etileno ha sido descrito como un subproducto negativo en la embriogénesis somática por el TDZ (Hutchinson et al., 1997), por lo que es probable que la hiperhidricidad inducida por la TDZ pueda ser una respuesta indirecta al incremento en la producción de etileno.

La exposición prolongada al TDZ también puede conducir en la acumulación de compuestos fenólicos, como se reportó durante la inducción de la embriogénesis somática de *Pelargonium × hortorum* (Hutchinson & Saxena, 1996).

En nuestra investigación también se realizó otro ensayo, donde los callos embriogénicos originados a partir de hojas cotiledonares, se subcultivaron intactos en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), para un mejor desarrollo de los embriones, sin embargo al corto tiempo los explantes comenzaron a necrosarse, esto posiblemente debido al cambio abrupto de medio y reguladores de crecimiento, así como también la sacarosa, que en el medio suplementado con TDZ se empleó 60 g/L y el medio de subcultivo solo tenía 30 g/L, se sabe que la sacarosa ayuda en la regeneración y crecimiento de tejidos, resultados similares obtuvo Criollo et al. (2014), donde empleo 30, 60 y 90 g/L de sacarosa en la inducción de embriogénesis somática en *S. quitoense*, siendo el mejor resultado el 90 g/L.

La inducción *in vitro* de embriones somáticos en condiciones controladas y fácilmente manipulables ofrece una oportunidad única para estudiar la vía de desarrollo que conduce a la embriogénesis somática. En la familia Solanaceae, el efecto de TDZ en la embriogénesis no ha sido muy estudiado, Gill & Saxena (1993), examinaron la inducción embriones somáticos por diferentes reguladores de crecimiento empleando explantes de discos foliares de *Nicotiana tabacum*, se

produjeron embriones somáticos en presencia de TDZ en todas las concentraciones en el rango de (0,05 – 3,30 mg/L) de TDZ, se observaron embriones somáticos al cabo de una semana, pero conforme se fue disminuyendo la dosis de TDZ, se retrasó la aparición de embriones hasta en 15 días, también se evaluó 4,40 mg/L de TDZ, pero los explantes no respondieron tras un mes de observación, esto concuerda con autores antes descritos, donde altas dosis de TDZ puede ocasionar la muerte del tejido o aberraciones. En *Capsicum annuum* L. empleando 3,0 mg/L de TDZ a partir de cotiledones se obtuvo en promedio 51,3% de respuesta de embriogénesis somática con más de 9 embriones por explante (Jayapadma et al., 2008)

Dentro de la misma especie de *S. quitoense*, Criollo et al. (2014) estudio el efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento ANA, kinetina y sacarosa (fuente de carbohidratos) en la inducción de embriogénesis somática de naranjilla, concluyendo que la respuesta embriogénica depende del genotipo y del explante así como la dosis auxina/citoquinina, el autor obtuvo hasta 50% de estructuras embrionarias con 5,94 y 9,31 mg/L de ANA, además menciona que la sacarosa mejora la eficiencia de la embriogénesis somática.

Así pues, la embriogénesis somática parece depender siempre del tipo de auxina / citoquinina u citoquinina y de sus concentraciones en el medio. El tipo de regulador de crecimiento y su dosis varía de un genotipo a otro. Una concentración de TDZ sin combinación con auxinas indujo la embriogénesis somática y la combinación de AG3 y citoquininas o solamente el medio MS libre de crecimiento indujo la aparición de plúmula y radícula en los embriones somáticos en *S. quitoense*.

La regeneración mediante embriogénesis somática es mucho mejor que mediante la organogénesis, para obtener plantas genéticamente uniformes. La embriogénesis somática es un proceso en el que se desarrollan estructuras bipolares similares a los embriones cigóticos a partir de células no cigóticas sin conexiones vasculares con el tejido original (Solís-Ramos et al., 2010). Del presente estudio se desprende que la embriogénesis somática de *S. quitoense* será útil para la conservación y fitomejoramiento. La embriogénesis somática también se prefiere porque permite la producción de plantas sin variación somaclonal y también se utiliza para la transformación genética (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016), como la

regeneración de plantas transgénicas, donde se ha utilizado junto con *Agrobacterium spp.* (Gale et al., 1988).

Se ha demostrado que el tejido foliar puede ser inducido a formar embriones somáticos bajo la influencia de la TDZ. En la inducción de la embriogénesis somática *in vitro*, factores como el tipo de explante, el genotipo, la concentración y combinaciones de reguladores de crecimiento cumplen un rol primordial. Los embriones somáticos inducidos de *S. quitoense*, pueden utilizarse para el desarrollo de la tecnología de semillas sintéticas, para el almacenamiento, la conservación y el intercambio de germoplasma, además, ofrece nuevas posibilidades para investigar el papel de señales específicas en la regulación de estos procesos de desarrollo.

#### **4.2. Desarrollo y crecimiento de embriones somáticos.**

Un factor que limita el uso de embriones somáticos es la falta de protocolos fiables para la inducción, el desarrollo y su transformación, este último es fundamental para el éxito final de cualquier sistema basado en la embriogénesis somática (Corredoira et al., 2019; Rihan et al., 2017), especialmente en especies recalcitrantes como *S. quitoense* (Criollo et al., 2014), las tasas de conversión embrionaria varían ampliamente entre genotipos, especies y medios de cultivo (Venkatachalam et al., 2003). En el presente estudio, el uso de diferentes medios con o sin reguladores del crecimiento favoreció la emergencia de plúmula y radícula de embriones somáticos. Los datos registrados sobre la etapa de crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos de *S. quitoense* para los cuatro tratamientos examinados fueron estadísticamente similares y no hubo diferencias entre ellos. El uso de reguladores de crecimiento como BAP, AG<sub>3</sub> y KIN en el medio no aumentó la aparición de plúmula y radícula de los embriones somáticos en comparación con el medio MS libre de reguladores del crecimiento.

La fase de crecimiento y desarrollo, llamada en algunos artículos “germinación”, ha sido estudiada en muchas especies de la familia Solanaceae, en papa (*Solanum tuberosum*), Pretova & Dedicova (1992), De García & Martínez (1995), Seabrook & Douglass (2001), Jayasree et al. (2001) y Vargas et al. (2005), emplearon medio de cultivo MS libre de crecimiento en la germinación de embriones somáticos, obteniéndose de 20 a 50% de conversión de plántulas, por otra parte, Kaur et al. (2018) emplearon 2,25 mg/L de BA y 5,20 mg/L de AG<sub>3</sub>, con 92% de conversión a

plántulas. El ácido abscísico y el estrés osmótico son factores importantes para la maduración de las semillas en muchas dicotiledóneas (Correia et al., 2012). La inclusión de ABA en el medio de cultivo en las etapas finales del desarrollo del embrión somático, simulando el aumento natural que se produce en los embriones afecta favorablemente a la maduración de embriones somáticos (Buyukalaca & Mavituna, 1996). Para futuras investigaciones en *S. quitoense*, se podría emplear ABA y ácido giberélico en la germinación de embriones somáticos, dado que, en nuestro estudio, la germinación no fue la mejor (40 – 60%).

En tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), Guimarães et al. (1988), Canhoto et al. (2005), Correia et al. (2011), (Correia et al. (2012), (Correia et al. (2012) y Mano et al. (2015), emplearon medio MS basal sin reguladores de crecimiento con sacarosa 20 a 25 g/L, en la germinación de embriones. La reducción de las dosis de macro y micronutrientes del medio MS a la mitad no mejoró la germinación ni el desarrollo posterior de los embriones. La fase de germinación de la embriogénesis somática en esta especie no necesita la adición de reguladores de crecimiento en el medio de germinación. Según los autores mencionados, el uso del medio MS libre de reguladores del crecimiento es suficiente para lograr una elevada tasa de germinación y conversión a plántulas.

En tomate (*Solanum lycopersicum*), Gill et al., (1995) y Newman et al. (2010) emplearon medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento en la germinación de embriones somáticos, por otra parte, Moghaieb et al. (1999) en *S. lycopersicum* cvs. (UC-97, pontarozza y zuishi) emplearon medio de cultivo MS suplementado con ANA (0,1 mg/L) y BA (0,1 mg/L), Mangamoori et al. (2011), en *S. lycopersicum* cv. S-22 la máxima frecuencia de germinación se observó con BAP (3,0 mg/L) + AG<sub>3</sub> (0,2 mg/L), también se probaron medios basales MS y ½ MS, pero no germinaron. Jan et al. (2015), en *S. lycopersicum* cv. Peto-86 emplearon medio MS suplementado con AIA (0,5 mg/L) y BAP (3,0 mg/L) obteniéndose un porcentaje de conversión en plántulas de 87%. En este cultivo también se ha evaluado el empleo de extractos de algas para la germinación, Vinoth et al. (2014), registro que la mayor tasa de germinación de *S. lycopersicum* se dio en el medio que contenía MS + 10% de *Caulerpa scalpelliformis* (más de un tipo reguladores de crecimiento vegetal, BAP y AIB fueron revelados en un análisis de las algas), el medio MS libre de reguladores de crecimiento solo formo callos y cuando se adiciono BAP al medio

de cultivo, solo dio origen a la plúmula del embrión somático, esto indicaría que los extractos de algas contienen más de un grupo de hormonas promotoras del crecimiento vegetal. En estudios realizados por Saeed et al. (2019), embriones somáticos de *S. lycopersicum* cvs. Rio grande, Roma, M82 e híbrido 17905, germinaron en medio de cultivo MS suplementado con 5,0 mg/L de TDZ o BAP, donde formaron brotes adventicios y raíces simultáneamente. La germinación de embriones somáticos en cultivares de *S. lycopersicum* requiere auxinas, citoquininas, ácido giberélico, entre otros, mientras que algunos cultivares sólo requieren medio MS libre de reguladores de crecimiento para germinar, con tasas de transformación de embriones que varían mucho entre genotipos, especies y medios de cultivo (Venkatachalam et al., 2003). En tomate silvestre (*Lycopersicon peruvianum*), el medio MS libre de reguladores de crecimiento fue suficiente para la etapa de germinación (Zapata & Sink, 1981), por otra parte, Rzepka-Plevnes et al. (2007) demostraron una buena capacidad de regeneración en el medio MS que contenía las sales inorgánicas básicas y compuestos orgánicos de MS suplementados con AIA o kinetina, el mayor número de embriones regenerados (80 y 78%) se observó en el medio que contenía 0,2 y 0,4 mg/L de kinetina.

En ají (*Capsicum annum* L.), la etapa de germinación de embriones somáticos ha sido muy estudiada, Harini & Lakshmi Sita (1993), Kintzios et al. (2000), Bodhipadma & Leung (2002), y Kintzios et al. (2001), emplearon medio MS con 1,0 mg/l de AG<sub>3</sub> más 2% de sacarosa para lograr la germinación, asimismo, obtuvieron 1,1% de plantas regeneradas empleando MS más 8% de sacarosa suplementado con BA y 2,4D con 2,9 mg/L y 1,98 mg/L respectivamente. Binzel et al. (1996), obtuvieron más del 70% de embriones germinados en medio de cultivo MS con 0,96 mg/L o 0,01 mg/L de AG<sub>3</sub>/TDZ, solos o combinados; los autores mencionan que el empleo de TDZ en el medio de germinación permitió que las plántulas sean más sanas y robustas, que el tratamiento empleando AG<sub>3</sub>, así mismo, Kaparakis & Alderson (2008) también emplearon ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en combinación con medio MS más 2% de sacarosa, donde la dosis de 1,0 mg/L de AG<sub>3</sub> obtuvo 15% de germinación. El empleo de ácido abscísico (ABA) también ha sido reportado en esta especie, Buyukalaca & Mavituna (1996) obtuvieron la mayor tasa de germinación en medio de cultivo MS a media potencia + 0,50 mg/L de ABA en oscuridad absoluta, en otros estudios 3 mg/L de ABA obtuvieron mejores resultados de germinación en presencia

de 16:8 luz oscuridad (Jayapadma et al., 2008). Jo et al. (1996) emplearon ½ MS más vitaminas B<sub>5</sub> más 1% de sacarosa y 250 mg/L de hidrolizado de caseína. Por otra parte, Steinitz et al. (2003) emplearon medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento en la etapa de germinación, germinaron, sin embargo, los embriones no tenían un brote y algunos de ellos tenían un solo cotiledón deformado mientras que otros no tenían cotiledones, algo similar ocurrió en las investigaciones de Han & Kim (2009) y Aboshama (2011), donde el uso de medio de cultivo MS permitió la germinación total, sin la presencia de aberraciones, sin embargo, al aumentar la concentración de sacarosa, la germinación de embriones somáticos se redujo. Poco a poco estas metodologías han ido mejorando, la última reportada es por Ugandhar et al., (2011), emplearon medio de cultivo MS + 0,5 mg/L de AIA + 3,0 mg/L de TDZ, logrando 75% de embriones somáticos germinados y 80% de supervivencia de plántulas durante la etapa de aclimatación, esta metodología puede ser aplicada a *S. quitoense*, para aumentar la tasa de germinación de embriones somáticos y reducir las aberraciones (embriones sin plúmula o radícula ) que se presentaron en nuestro estudio, además, solo el 2,5% se convirtió en plántulas, presentando un gran problema para futuras investigaciones de mejora genética de este cultivo.

Otra especie estudiada de ají es *Capsicum chinense*, donde Solís-Ramos et al. (2010) emplearon medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento, logrando 75% de germinación de embriones; al añadir 0,4 mg/L de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo la germinación se redujo a 60% (López-Puc et al., 2006). Estos autores también reportan aberraciones o anomalías en los embriones, lo ocasiona problemas durante la germinación. En otra especie de ají, Venkataiah et al. (2016), obtuvieron 55% de germinación y conversión a plántulas de *C. baccatum* empleando medio MS más 1,0 mg/L de BA, esta última es una citoquinina. En nuestro estudio se obtuvieron resultados similares en todos los tratamientos evaluados, con una germinación mayor al >40%, ya sea en medio libre de reguladores de crecimiento o empleando citoquininas como KIN y BAP, suplementadas con AG<sub>3</sub>, el cuello de botella de nuestro estudio se encuentra en la conversión a plántulas, pues los embriones germinaron, pero entraron en un estado de latencia y su posterior necrosamiento, sería necesario el cambio de medio de cultivo.

En berenjena (*Solanum melongena*), los primeros reportes de embriogénesis somática son de los años ochenta, donde se germinaron embriones somáticos en

medio de cultivo B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968) o medio MS libre de reguladores de crecimiento (Gleddie & Setterfield, 1983), el empleo de medio B<sub>5</sub> a la mitad también favorecieron la germinación (Hitomi et al., 1998). Estudios posteriores también emplearon el medio MS basal sin hormonas (Mohammad et al., 1991; Rao, 1992; Sharma & Rajam, 1995; Tarré et al., 2004; Swamynathan et al., 2010; Mian & Akhond, 2016) o MS a media potencia (Magioli et al., 2001). Sin embargo, se presentaron anomalías, las cuales pudieron ser reducidas empleando ABA o AG<sub>3</sub>, empero, no tuvieron éxito o tuvieron tasas muy bajas de desarrollo completo. Por otro lado, Picoli et al. (2000), optimizaron la germinación al emplear 0,05 mg/L de AG<sub>3</sub> más medio de cultivo MS en *S. melongena* cv. Embú, recientemente se empleó medio MS que contenía 4,50 mg/L de BAP más 2,0 mg/L de AG<sub>3</sub> y ANA en la germinación de embriones somáticos de *S. melongena* cv. Ghalami Varamin (Sabet et al., 2020). Con la finalidad optimizar la etapa de germinación de embriones, el uso de compuestos orgánicos como el carbón activado ha sido reportado en esta especie; carbón activado (0,2%) y la combinación de citoquininas (2,50 mg/L de BAP + 1,00 mg/L de Kin) favoreció la germinación de embriones de *S. melongena* (Kaur et al., 2011) y cultivares BSR-27, BR-16 y BL-7 (Kaur et al., 2013). Otras investigaciones, evaluaron la ventilación de los recipientes de medio de cultivo, donde los medio MS sin hormonas con un filtro de ventilación aséptica favoreció la germinación, caso contrario ocurrió en los medio de cultivo tapados con papel aluminio, donde los embriones no germinaron normalmente (Saito & Nishimura, 1994). El efecto del empleo de reguladores de crecimiento o compuestos orgánicos como el carbón activado en la germinación de embriones somáticos va a depender de los cultivares que se está estudiando. Los estudios antes mencionados pueden ser aplicados en la germinación de *S. quitoense*, sin embargo, el resultado es no sabido, pues son especies distintas.

En otras solanáceas, como *S. torvum*, la máxima frecuencia de germinación (75%) de embriones somáticos y formación de plántulas se encontró empleando medio de cultivo MS suplementado con AIA (0,5 mg/L) + BAP (2,00 mg/L), mas no germinaron en medios ½ MS y MS (Maloth et al., 2021). En *S. trilobatum*, se observó la germinación de embriones en medio de cultivo MS suplementado con 0,01 mg/L de AG<sub>3</sub>, 0,10 mg/ de ANA y 0,10 mg/L de KIN, sin embargo, se tuvo baja tasa de conversión en plántulas (Charumathy et al, 2004). En *S. nigrum*, la mayor

frecuencia de germinación de embriones (73.8%) se observó en el medio de cultivo con 0,50 mg/L de AIA + 1,50 mg/L de BAP, mientras que la frecuencia de germinación de embriones se redujo en altas concentraciones de BAP, no germinaron en medio de cultivo MS a media potencia y tampoco en medio MS libre de reguladores del crecimiento (Sharada et al., 2019). Algo similar ocurrió en *S. surattense*, donde los embriones no lograron germinar en los medios de cultivo ½ MS y MS, el porcentaje máximo (71,2%) de germinación de embriones y su posterior formación de plántulas se encontró con AIA + BAP, 0,5 mg/L y 2,0 mg/L respectivamente (Swamy et al., 2005). En *S. virgianum*, se empleó solamente el medio MS para la germinación (Patil & Patil, 2022) al igual que en *Nicotiana* spp. (Pathi et al., 2013), en este último también se empleó TDZ a dosis 0,22 mg/L obteniéndose un 90% de embriones germinados. Dosis mayores de TDZ inhibieron la germinación de *Nicotiana tabacum* (Gill & Saxena, 1993). En el género *Physalis*, Escobar-Guzmán et al. (2009), emplearon medio de cultivo MS + 0,10 mg/L de ANA, 2,00 mg/L de BA e hidrolizado de caseína (50 mg/L) para la germinación de embriones de *P. ixocarpa*, por otra parte, el medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento fue suficiente para la germinación de embriones somáticos de *P. pubescens* (Yousry, 2013).

En el presente estudio, para la germinación de embriones somáticos fue suficiente un medio basal sin reguladores del crecimiento, ya que los tratamientos con reguladores del crecimiento no fueron estadísticamente diferentes de los demás tratamientos probados. La regeneración con embriogénesis somática es favorable para la modificación genética y la propagación de esta especie debido al origen unicelular y al crecimiento bipolar de los embriones. Se espera que el sistema de regeneración desarrollado en este estudio facilite nuestros esfuerzos por producir genotipos únicos de valor comercial.

## V. CONCLUSIONES

Empleando el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), explantes jóvenes de naranjilla (hipocótilos, hojas cotiledonares y yemas terminales), fue posible, obtener embriones somáticos en el medio de inducción de embriogénesis somática suplementado con 0,50 mg/L de TDZ, 40 días después de la siembra, y como único explante que tuvo respuesta fueron las hojas cotiledonares.

La adición de ácido naftalenacético (ANA) solo o en combinación con Thidiazuron (TDZ), en hipocótilos, hojas cotiledonares y yemas terminales solo generaron la formación de callo friable y/o compacto.

La adición de Thidiazuron (TDZ) en el medio de cultivo provocó que hipocótilos y yemas terminales formaran callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático con 76,7% y 93,3% respectivamente. En hojas cotiledonares se observó callo embriogénico con la presencia de embriones con una media de 4,1 embriones por explante.

Todos los reguladores de crecimiento evaluados en la etapa de crecimiento y desarrollo resultaron ser estadísticamente iguales, con un porcentaje superior al 40%, la etapa de crecimiento y desarrollo consistió en la emergencia de plúmula y radícula de los embriones somáticos (llamada fase de germinación en algunos artículos)

## VI. RECOMENDACIONES

Emplear otros reguladores de crecimiento solos o en combinación para la obtención de embriones somáticos.

Usar diferentes dosis de TDZ para ver si el número de embriones somáticos aumenta o se reduce, o en todo caso hay inhibición de respuesta por parte de los explantes.

Emplear otros cultivares de *S. quitoense*, ya que, la respuesta embriogénica depende del cultivar y así comparar los diferentes cultivares a diferentes dosis de reguladores de crecimiento.

Diseñar un protocolo de regeneración de embriones somáticos a plántulas de *S. quitoense* L., es bien sabido que la conversión a plántulas es el cuello de botella de la embriogénesis somática.

Elaborar un protocolo de embriogénesis somática indirecta para el cultivo de *S. quitoense*, este tipo de embriogénesis da un mayor número de embriones somáticos a partir de callo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboshama, H. (2011). Direct Somatic Embryogenesis of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(6), 755–762.
- Ahmad, N., & Faisal, M. (2018). Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator. *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*, 1–491. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3>
- Amirova, A., Dossymbetova, S., Rysbayeva, Y., Usenbekov, B., Tolegen, A., & Ydyrys, A. (2022). Multiple Plant Regeneration from Embryogenic Calli of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. *Plants*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/plants11081020>
- Bajaj, Y. P. S. (1995). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I* (Vol. 30). Springer Science & Business Media.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 1–309. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., & Sankhla, D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15(7), 536–540. <https://doi.org/10.1007/BF00232989>
- Bodhipadma, K., & Leung, D. W. M. (2002). Factors important for somatic embryogenesis in zygotic embryo explants of *Capsicum annuum* L. *Journal of Plant Biology*, 45(1), 49–55. <https://doi.org/10.1007/bf03030432>
- Buyukalaca, S., & Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3), 227–235. <https://doi.org/10.1007/BF02307099>
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L., & Cruz, G. S. (2005). Protocol of Somatic Embryogenesis: Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 379–389. [https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3\\_30](https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_30)
- Cavalcante Granja, M. M., Lacerda E Medeiros, M. J., Medeiros de Andrade Silva, M., Camara, T., Willadino, L., & Ulisses, C. (2018). Respuesta *in vitro* al estrés

salino en caña de azúcar esta condicionada por la concentración y condición de exposición al NaCl. *Acta Biológica Colombiana*, 2323(11), 30–38. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v23n1/0120-548X-abc-23-01-00030.pdf>

- Charumathy, J., Alagumanian, S., Jeyaseelan, M., & Rao, M. V. (2004). Somatic embryogenesis in *Solanum trilobatum* L. *Recent trends in biotechnology*, 53–59.
- Chen, J. R., Wu, L., Hu, B. W., Yi, X., Liu, R., Deng, Z. N., & Xiong, X. Y. (2014). The Influence of Plant Growth Regulators and Light Quality on Somatic Embryogenesis in China Rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 295–304. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9371-3>
- Chen, J. T., & Chang, W. C. (2000). Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* Sweet Sugar. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(2), 95–100. <https://doi.org/10.1023/A:1026591003553>
- Collinet, C., & Lecuit, T. (2021). Programmed and self-organized flow of information during morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(4), 245–265. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00318-6>
- Corredoira, E., Merkle, S. A., Martínez, M. T., Toribio, M., Canhoto, J. M., Correia, S. I., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (2019). Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(1), 29–97. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Correia, S., Cunha, A. E., Salgueiro, L., & Canhoto, J. M. (2012). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): Approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(1), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0082-9>
- Correia, S., Lopes, M. L., & Canhoto, J. M. (2011). Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees - Structure and Function*, 25(6), 1009–1020. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0575-5>
- Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A. S., Veríssimo, P., & Canhoto, J. M. (2012). Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and

- Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *Journal of Proteome Research*, 11(3), 1666–1675. <https://doi.org/10.1021/pr200856w>
- Criollo, H., Perea, M., Toribio, M., & Muñoz, J. (2014). Effect of the combination of NAA, kinetin and sucrose on the induction of somatic embryogenesis in lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Agronomía Colombiana*, 32(2), 170–179. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n2.43861>
- Cruz, A., Coronado, M., Rodríguez, P., & Coronado, Y. M. (2019). Morphological Characterization of Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) in the Municipality for Pachavita, Boyacá. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2), 291–298.
- De García, E., & Martínez, S. (1995). Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée from Stem Nodal Sections. *Journal of Plant Physiology*, 145(4), 526–530. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81782-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81782-7)
- de Jiguina, A. D. P. A. (2007). Cultivos de diversificación para pequeños productores de frijol y maíz en América Central: naranjilla (lulo) y cocona. Guía práctica de manejo agronómico, cosecha, poscosecha y procesamiento de naranjilla.
- El-Ashry, A. A. E., Gabr, A. M. M., & Bekheet, S. A. E. (2017). Zeatin and Thidiazuron Induced Embryogenic Calli From *In Vitro* Leaf and Stem of Jojoba (*Simmondsia chinensis*). *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 20(7), 355-364.
- Escobar-Guzmán, R. E., Hernández-Godínez, F., Martínez De La Vega, O., & Ochoa-Alejo, N. (2009). *In vitro* embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(2), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9474-x>
- Etienne, H. (2005). Somatic embryogenesis protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer.
- Feng, J., Shi, Y., Yang, S., & Zuo, J. (2017). Cytokinins. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00003-7>

- Fiola, J. A., Hassan, M. A., Swartz, H. J., Bors, R. H., & McNicols, R. (1990). Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20(3), 223–228. <https://doi.org/10.1007/BF00041885>
- Fujimura, T., & Komamine, A. (1979). Involvement of Endogenous Auxin in Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 95(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(79\)80023-9](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(79)80023-9)
- Gale, H. M., Charles, A. L., Sandra, L. U., Lori, A. M., & Dandekar, A. M. (1988). Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Nature Publishing Group*, 6(1), 800–804.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gatica, Andrés M.; Arrieta, Griselda; Espinoza, A. M. (2008). Direct somatic embryogenesis in *coffea arabica* L. cvs. caturra and catuaí: effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. *Agronomía Costarricense*, 32, 139–147.
- Gill, J., Gerrarth, J., & Saxena, P. K. (1993). High-frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*). *Canadian Journal of Botany*, 71(3), 408–413.
- Gill, R., Malik, K. A., Sanago, M. H. M., & Saxena, P. K. (1995). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Seedling Cultures of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Plant Physiology*, 147(2), 273–276. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81518-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81518-X)
- Gill, R., & Saxena, P. K. (1993). Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports*, 12(3), 154–159. <https://doi.org/10.1007/BF00239097>
- Gleddie, S., & Setterfield, G. (1983). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant)'. *Canadian Journal of Botany*, 61, 656–666.

- Godishala, V., Mangamoori, L., & Nanna, R. (2011). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, *11*(1), 2521–2528.
- Grout, B. (2016). General Principles of Tissue Culture. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2nd ed., Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00143-X>
- Guimarães, M. L. S., Cruz, G. S., & Montezuma-De-Carvalho, J. M. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, *15*, 161–167.
- Haensch, K. T. (2004). Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis. *Plant Cell Reports*, *23*(4), 211–217. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0844-5>
- Han, J., & Kim, J. (2009). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from plumules of hot pepper seedlings. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, *27*(3), 482-488.
- Hannachi, S., Werbrouck, S., Bahrini, I., Abdelgadir, A., Siddiqui, H. A., & Van Labeke, M. C. (2021). Obtaining salt stress-tolerant eggplant somaclonal variants from *in vitro* selection. *Plants*, *10*(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10112539>
- Harini, I., & Lakshmi Sita, G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annum* L.). *Plant Science*, *89*(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90176-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90176-Z)
- Henaó Ramírez, A. M., de la Hoz Vasquez, T., Ospina Osorio, T. M., Garcés, L. A., & Urrea Trujillo, A. I. (2018). Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, *229*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.040>
- Hendrix, R. C., Litz, R. E., & Kirchoff, B. K. (1987). *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl, *S. quitoense* Lam. (naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,

11(1), 67–73. <https://doi.org/10.1007/BF00036577>

- Hitomi, A., Amagai, H., & Ezura, H. (1998). The influence of auxin type on the array of somaclonal variants generated from somatic embryogenesis of eggplant, *Solanum melongena* L. *Plant Breeding*, 117(4), 379–383. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1998.tb01957.x>
- Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(2), 105–119. <https://doi.org/10.1007/BF01983223>
- Hutchinson, M. J., Murr, D., Krishnaraj, S., Senaratna, T., & Saxena, P. K. (1997). Does ethylene play a role in thidiazuron-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium X hortorum* Bailey) hypocotyl cultures? *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 33(2), 136–141. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0012-z>
- Hutchinson, Margaret J., & Saxena, P. K. (1996). Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Reports*, 15(7), 512–515. <https://doi.org/10.1007/BF00232984>
- Ipekci, Z., & Gozukirmizi, N. (2003). Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Reports*, 22(1), 16–24. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0650-5>
- Jan, S. A., Shah, S. H., Ali, S., & Ali, G. M. (2015). The effect of plant growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis of hybrid tomato. *Pakistan Journal of Botany*, 47(5), 1671–1677.
- Jayapadma, P. N., Sumangala, B., & Kuruvinashetti, M. S. (2008). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in chilli (*Capsicum annuum* L). *Asian Journal of Bio Science*, 3(1), 61-65.
- Jayasree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A. V, Reddy, K. J. M., & Sadanandam, A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 13–17.
- Jo, J. Y., Choi, E. Y., Choi, D. S., & Lee, K. W. (1996). Somatic Embryogenesis and

- Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryo Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biology*, 39(2), 127–135.
- Joshi, M., Sujatha, K., & Hazra, S. (2008). Effect of TDZ and 2, 4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 85–90. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9390-0>
- Kantharajah, A. S., & Golegaonkar, P. G. (2004). Somatic embryogenesis in eggplant. *Scientia Horticulturae*, 99(2), 107–117. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00090-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00090-6)
- Kaparakis, G., & Alderson, P. G. (2008). Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)? *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(2), 110–114. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9037-0>
- Karami, O., Aghavaisi, B., & Mahmoudi Pour, A. (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of Chemical Biology*, 2(4), 177–190. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0028-4>
- Kaur, A., Reddy, M. S., & Kumar, A. (2018). Direct somatic embryogenesis of potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivar ‘Kufri Chipsona 2.’ *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(3), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1435-4>
- Kaur, M., Singh Dhatt, A., Singh Sandhu, J., Sidhu, A. S., & Gosal, S. S. (2013). Effect of media composition and explant type on the regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.). *African Journal of Biotechnology*, 12(8), 860–866. <https://doi.org/10.5897/AJB12.554>
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., & Lympelopoulou, C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 55–62. <https://doi.org/10.1023/A:1011610413177>
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., Shortsiianitis, E., & Peppes, D. (2000). Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): Effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*, 85(1–2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00135-1)

- Lakshmanan, P., & Taji, A. (2000). Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*, 2(2), 136–148. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9159>
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Montalvo-Peniche, M. D. C., Barahona-Pérez, F., Santana-Buzzy, N., & Iglesias-Andreu, L. (2006). Direct somatic embryogenesis: A highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645–1650. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.7.1645>
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Lu, C., Vasil, I. K., & Ozias-Akins, P. (1982). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 62(2), 109–112. <https://doi.org/10.1007/BF00293341>
- Magioli, C., Machado Rocha, A. P., Tarre, E., Santiago-Fernandez, L. D., de Oliveira, D. E., Krul, W.-R., & Mansur, E. (2001). Effect of Morphological Factors, Antibiotics and Agrobacterium Co-cultivation in the Efficiency of Somatic Embryogenesis of Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Plant Biotechnology*, 3(1), 19–25. <https://koreascience.kr/article/JAKO200111921597047.page>
- Maloth, G. S., Marka, R., & Nanna, R. S. (2021). Effect of Plant Growth Regulators on Somatic Embryogenesis and Plantlet Development of Turkey Berry (*Solanum torvum* SW). *European Journal of Medicinal Plants*, 32(7), 1–8. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2021/v32i730400>
- Mangamoori, L. N., Godishala, V., Mangamoori, L., & Nanna, A. (2011). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(1), 2521–2528.
- Mano, N., Correia, S., & Canhoto, J. M. (2015). Improving the efficiency of maturation and conversion of tamarillo somatic embryos. *Acta Horticulturae*, 1083, 435–444. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.56>
- Matsuta, N., & Hirabayashi, T. (1989). Embryogenic cell lines from somatic embryos

- of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 7, 684–687.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (In vitro e, pp. 155–203). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_5)
- Mithila, J., Hall, J. C., Victor, J. M. R., & Saxena, P. K. (2003). Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Reports*, 21(5), 408–414. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0544-y>
- Moghaieb, R. E. A., Saneoka, H., & Fujita, K. (1999). Plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(3), 639–646. <https://doi.org/10.1080/00380768.1999.10415827>
- Mohammad, A., Hiroshi, O., & Kunimitsu, F. (1991). In Vitro Multiplication of Intra- and Interspecific *Solanum* Hybrids through Somatic Embryogenesis and Adventitious Organogenesis. *Horticultural Society Magazine*, 60(3), 601–612. <https://doi.org/https://doi.org/10.2503/jjshs.60.601>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Murthy, B. N. S., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (1998). Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(4), 267–275.
- Murthy, B. N. S., Victor, J., Singh, R. P., Fletcher, R. A., & Saxena, P. (1996). In vitro regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. *Plant Growth Regulation*, 19(3), 233–240.

- Neuman, M. C., Preece, J. E., Sambeek, J. W. Van, & Gaffney, G. R. (1993). Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 9–18.
- Newman, P. O., Krishnaraj, S., & Saxena, P. K. (2010). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-Benzyladenine. *International Journal*, 157(5), 554–560.
- Otiniano, J. (2017). *Elaboración y evaluación reológica de mermelada de naranjilla (Solanum quitoense Lam . )* ". UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA.
- Ouyang, Y., Chen, Y., Lü, J., Teixeira Da Silva, J. A., Zhang, X., & Ma, G. (2016). Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in *Metabriggsia ovalifolia* W. T. Wang. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep24662>
- Pathi, K. M., Tula, S., & Tuteja, N. (2013). High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium-mediated genetic transformation of tobacco. *Plant Signaling and Behavior*, 8(6). <https://doi.org/10.4161/psb.24354>
- Patil, D. S., & Patil, S. A. (2022). Regeneration via somatic embryogenesis from seed explant of medicinal plant *Solanum virgianum* (L.). *Archives of Internal Medicine Research*, 05(04), 488–493. <https://doi.org/10.26502/aimr.0138>
- Picoli, E. A. T., Otoni, W. C., Cecon, P. R., & Fari, M. (2000). Influence of antibiotics on NAA induced somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L. cv Embú). *International Journal Oh Horticultural Science*, 6(4), 88–95.
- Pretova, A., & Dedicova, B. (1992). Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée from Unripe Zygotic Embryos. *Journal of Plant Physiology*, 139(5), 539–542. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80366-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80366-4)
- Ramírez, F., Kallarackal, J., & Davenport, T. L. (2018). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) reproductive physiology: A review. *Scientia Horticulturae*, 238, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.046>

- Rao, P. L. (1992). Difference in somatic embryogenetic ability of cultured leaf explants of four genotypes of *Solanum melongena* L. *Agronomie*, *12*(6), 469–475. <https://doi.org/10.1051/agro:19920605>
- Remakanthan, A., Menon, T. G., & Soniya, E. V. (2014). Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): Effect of explant and culture conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *50*(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9546-4>
- Rihan, H. Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M. E., & Fuller, M. P. (2017). Artificial seeds (Principle, aspects and applications). *Agronomy*, *7*(4), 10–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy7040071>
- Rzepka-Plevnes, D., Kulpa, D., & Kurek, J. (2007). Somatic embryogenesis in callus cultures of tomato *Lycopersicon peruvianum* (L.) mill. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, *523*, 185–193.
- Sabet, H., Maleki, M., Abdoli Nasab, M., & Mirzaei, S. (2020). Somatic embryogenesis of hypocotyl derived calli from an eggplant cultivar. *Acta Agriculturae Slovenica*, *115*(1), 151–159. <https://doi.org/10.14720/AAS.2020.115.1.1314>
- Saeed, W., Naseem, S., Gohar, D., & Ali, Z. (2019). Efficient and reproducible somatic embryogenesis and micropropagation in tomato via novel structures - Rhizoid Tubers. *PloS One*, *14*(5), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215929>
- Saito, T., & Nishimura, S. (1994). Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Science*, *102*(2), 205–211. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90039-6)
- Saxena, P. K., Malik, K. A., & Gill, R. (1992). Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. *Planta*, *187*(3), 421–424. <https://doi.org/10.1007/BF00195667>
- Seabrook, J. E. A., & Douglass, L. K. (2001). Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Reports*, *20*(3), 175–182. <https://doi.org/10.1007/s002990000305>
- Sharada, D., Krishna, P. S., & Swamy, N. R. (2019). Plant Regeneration via Somatic

- Embryogenesis in *Solanum nigrum* L. (Black nightshade) (Solanaceae). *Biotechnology Journal International*, 23(1), 1–9. <https://doi.org/10.9734/bji/2019/v23i130070>
- Sheibani, M., Nemati, S. H., Davarinejad, G. H., Azghandi, A. V., & Habashi, A. A. (2007). Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ). *Acta Horticulturae*, 739, 259–267. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.739.32>
- Solís-Ramos, L. Y., Nahuath-Dzib, S., Andrade-Torres, A., Barredo-Pool, F., González-Estrada, T., & de la Serna, E. C. (2010). Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biologia*, 65(3), 504–511. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0049-z>
- Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., & Zelcer, A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39(3), 296–303. <https://doi.org/10.1079/IVP2002405>
- Swamy, N. R., Ugandhar, T., Praveen, M., Venkataiah, P., Rambabu, M., Upender, M., & Subhash, K. (2005). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon and leaf explants of *Solanum surattense*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(3), 414–418.
- Swamynathan, B., Nadanakunjidam, S., & Ramamourti, A. (2010). *In-Vitro* Plantlet Regeneration Through Somatic Embryogenesis in *Solanum melongena* (Thengaithittu Variety). *Academic Journal of Plant Sciences*, 3(2), 64–70. [http://idosi.org/ajps/3\(2\)10/3.pdf](http://idosi.org/ajps/3(2)10/3.pdf)
- Thorpe, T. A. (1993). *In vitro* Organogenesis and Somatic Embryogenesis: Physiological and Biochemical Aspects. In *Morphogenesis in Plants*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1265-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1265-7_2)
- Ugandhar, T., Venkateswarlu, M., Shekar, G. P. V., & Reddy, K. J. M. (2011). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf explants of *Capsicum annuum* using thidiazuron. *Bioscience Discovery Journal*, 2(2), 243-248.
- Vargas, T. E., De García, E., & Oropeza, M. (2005). Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: Histological analysis and

- extracellular protein patterns. *Journal of Plant Physiology*, 162(4), 449–456.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.07.001>
- Venkatachalam, P., Geetha, N., Priya, P., Jayabalan, N., & Lakshmi sita, G. (2003). Somatic Embryogenesis. In *Somatic embryogenesis. Improvement strategies of leguminosae biotechnology* (pp. 87–132).
- Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Suman Kalyan, S., & Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 55–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.02.001>
- Vinoth, S., Gurusaravanan, P., & Jayabalan, N. (2014). Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1527–1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0151-z>
- Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R., & Saxena, P. K. (1992). Morphoregulatory Role of Thidiazuron. *Plant Physiology*, 99(4), 1704–1707.  
<https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1704>
- Whalen, M. D., & Caruso, E. E. (1983). Phylogeny in *Solanum* sect . Lasiocarpa ( Solanaceae ): Congruence of Morphological and Molecular Data. *Systematic Botany*, 8(4), 369–380.
- Yousry, M. M. (2013). *In vitro* Propagation and Somatic Embryogenesis in Egiptian Husk Tomato (*Physalis pubescens* L.). *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3), 1415–1425.
- Zapata, F., & Sink, K. (1981). Somatic Embryogenesis from *Lycopersicon peruvianum* Leaf Mesophyll Protoplasts \*. *Theoretical and Applied Genetics*, 59(5), 265–268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00264977>
- Zürcher, E., & Müller, B. (2016). Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function-Advances and New Insights. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 324). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.01.001>

## ANEXOS

### COMPOSICIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Macro y microelementos	Concentración (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>	
Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1650
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	1900
Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	440
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	170
<b>Micronutrientes</b>	
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8.6
Molibdato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.25
Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.025
<b>Fe-EDTA</b>	
Sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	27.8
EDTA de sodio férrico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	37.3
<b>Vitaminas</b>	
Glicina	2
Tiamina HCl (vitamina B <sub>1</sub> )	0.1
Piridoxina HCl (vitamina B <sub>6</sub> )	0.5
Ácido nicotínico (vitamina B <sub>3</sub> )	0.5
Myo-Inositol	100

Fuente: Murashige y Skoog (1962)

## ANEXO 02

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO DE INDUCCIÓN DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN NARANJILLA

#### ANOVA Factorial 3A x 4B bajo un diseño DCA

Software SAS/STAT

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Inducción

Analysis of variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	21280.2898	1934.5718	4.61	<.0001
Error	48	20121.572	419.19942		
Corrected total	59	41401.8618			

Variable	R-square	Coeff var	Root MSE	Inducción Mean
Inducción	0.513994	25.46932	20.47436	80.38833

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F value	Pr > F
A	2	2043.94233	1021.97117	2.44	0.0981
B	3	9871.10183	3290.36728	7.85	0.0002
A*B	6	9365.24567	1560.87428	3.72	0.004

**Procedimiento GLM**

**Test de Scheffé para la variable inducción**

Nota: Esta prueba controla la tasa de error de tipo I del experimento.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	419.1994
Critical Value of F	3.19073
Minimum Significant Difference	16.356

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	88.34	20	a3
A	78.33	20	a2
A	74.495	20	a1

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.

### Procedimiento GLM

#### Test de Scheffé para la variable inducción

Nota: Esta prueba controla la tasa de error de tipo I del experimento.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	419.1994
Critical Value of F	2.79806
Minimum Significant Difference	21.661

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	93.34	15	b4
A	92.213	15	b3
AB	72.667	15	b2
B	63.333	15	b1

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.

### ANEXO 03

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE NARANJILLA

### ANOVA DCA Crecimiento y desarrollo de embriones somáticos

#### Procedimiento ANOVA

#### Variable dependiente: Crecimiento y desarrollo

Analysis of variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.021826	0.0072753	0.89	0.4588
Error	27	0.2206678	0.0081729		
Corrected total	30	0.2424938			

Variable	R-square	Coeff var	Root MSE	Germinación Mean
Crecimiento y desarrollo	0.090006	9.305923	0.090404	0.971467

Source	DF	ANOVA SS	Mean Square	F value	Pr > F
Tratamiento	3	0.021826	0.0072753	0.89	0.4588

#### Test HSD de Tukey para la variable crecimiento y desarrollo

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	0.008173
Critical Value of Studentized Range	3.87009
Minimum Significant Difference	0.1264
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.665399

NOTA: Los "Cell Sizes" no son iguales.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	1.00842	7	4
A	0.98467	9	3
A	0.95466	8	2
A	0.93674	7	1

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.