

Inducción al proceso de calogénesis *in vitro* a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de Guarango (*Caesalpinia spinosa*) como coadyuvante para su preservación en el Distrito Metropolitano de Quito

Ortega Gabriela., Soria Norman¹., Taipe Marco¹., Reyes Cristian²

¹Departamento de Ciencias de La Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE

²Laboratorio de Micropropagación Vegetal, EPMMOP-Q, Centro de Investigación Ambiental de Cununyacu (CIAC)

RESUMEN

El objetivo del presente estudio es desarrollar un protocolo de inducción a callo embriogénico a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*, como fase inicial de la Embriogénesis somática indirecta, además del establecimiento de cultivos asépticos en primera instancia. Las variables de desinfección consistieron en el uso de dos concentraciones de NaClO (0,5 y 1,5%) durante dos tiempos de inmersión (5 y 10 min). Los resultados obtenidos arrojaron que el tratamiento con NaClO al 0,5% durante un tiempo de inmersión 5 min es el de mayor efectividad para el establecimiento de cotiledones, mientras que el tratamiento con NaClO al 0,5% durante 10 min es el de mayor efectividad para el establecimiento de ejes embriogénicos. En el ensayo preliminar de inducción a callo embriogénico los resultados indicaron que el tratamiento 1 (MS: 2,4D 2mg·L⁻¹ + Kin 1mg·L⁻¹) y el tratamiento 3 (MS: TDZ 0,2mg·L⁻¹ + AIA 0,05mg·L⁻¹) produjeron porcentajes considerables de formación de callo en cotiledones, mientras que en ejes embriogénico la respuesta de formación de callo embriogénico fue baja en todos los tratamientos aplicados. En el ensayo final de inducción a callo a partir de cotiledones, en donde en el medio MS suplementado con 2,4-D (4 mg·L⁻¹) + Kin (2 mg·L⁻¹) se presentó porcentajes de formación de callo embriogénico del 100%. La macromorfología evidenció callos embriogénicos translúcidos y friables. El estudio histológico indicó una diferenciación de células embriogénicas en proceso de mitosis que presentaban estructuras características.

ABSTRACT

The objective of this study is to develop a protocol to embryogenic callus induction from cotyledons and embryogenic axes of mature seeds of Guarango (*Caesalpinia spinosa*), as the initial phase the ES indirect, and the establishment of aseptic cultures in the first instance. Disinfection variants consisted in using two concentrations of NaOCl (0.5 and 1.5%) for two immersion times (5 to 10 min). The results showed that treatment with 0.5% NaClO during an immersion time of 5 min is the most effective for establishing cotyledons, while treatment with 0.5% NaClO for 10 min is the most effectiveness for establishing embryogenic axes. In the preliminary test embryogenic callus induction results indicated that treatment 1 (MS: 2.4 D 2mg·L⁻¹ + Kin 1mg·L⁻¹) and treatment 3 (MS: TDZ 0.2 mg·L⁻¹ + IAA 0.05 mg·L⁻¹) resulted in significant percentages of callus formation in cotyledons, while axis response embryogenic embryogenic callus formation was low in all treatments. In the final assay callus induction from cotyledons, where on MS medium supplemented with 2, 4-D (4 mg·L⁻¹) + Kin (2 mg·L⁻¹) percentages presented embryogenic callus formation was 100%. The macromorphology showed translucent and friable embryogenic callus. Histological examination showed an embryogenic cell differentiation mitosis presenting characteristic structures.

INTRODUCCIÓN

Caesalpinia spinosa es un árbol pequeño ramificado de tipo leguminoso – leñoso (Mancero, 2008). En la provincia de Pichincha se encuentra principalmente en las formaciones conocidas como valles secos interandinos (Narváez *et al.*, 2009). El guarango es una especie que debe ser conocida y reconocida por todo su potencial forestal y productivo conjuntamente en el aporte para la recuperación y fortalecimiento de suelos explotados, deforestados o en asociación con sembríos, sin olvidar que se potencializa como una opción distinta para la mejora de la economía agrícola.

La necesidad de grandes cantidades de ejemplares de especies nativas forestales demandadas por el Municipio del Distrito Metropolitano de Quito en los proyectos de Forestación y Reforestación, pero existe ciertas limitaciones, y es que los viveros utilizan prácticas tradicionales de cultivo y producción en la silvicultura, al igual que en el mejoramiento de árboles forestales además, el inconveniente de la obtención rápida y masiva de ejemplares forestales debido al largo ciclo de vida de estos, la gran cantidad de mano de obra y el amplio espacio en el campo experimental que se requiere, entre otras causas demandan recurrir a nuevas y mejores opciones como el cultivo *in vitro* que permite en cada caso solucionar inconvenientes imposible de superar por los métodos tradicionales.

Para la regeneración de forestales se puede tomar directamente varios tipos de explantes ya que las células vegetales cultivadas *in vitro* poseen totipotencialidad establecido por (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958), en virtud de esta característica del tejido vegetal, es decir, de su capacidad para formar yemas y raíces adventicias, casi cualquiera de los órganos de una planta vascular tiene relación con su propagación vegetativa al sufrir modificaciones anatómicas y funcionales que le permiten desarrollarse en un organismo vegetal completo e independiente, con las mismas características genéticas de la planta progenitora (Vázquez *et al.*, 1997) dándose una gran variedad de posibilidades biotecnológicas para dicha regeneración como es: caulogénesis, organogénesis, embriogénesis somática, entre otras.

La embriogénesis somática indirecta es uno de los métodos más ventajosos de propagación masiva de plantas por su alta tasa de multiplicación, desarrollo y transformación de embriones somáticos en plantas, pero previo a ello, la callogénesis es el primer paso crucial hacia la generación de embriones somáticos (Hernández *et al.*, 1999).

En el Laboratorio de Micropropagación del Centro de Investigaciones Ambientales de Cununyacu (CIAC) de la EPMOP-Q se está realizando investigaciones de micropropagación de especies nativas, necesarias para los proyectos de forestación y reforestación, de manera que se tiene ya protocolos de propagación *in vitro* a partir de plántulas y *ex vitro* a partir de semillas de guarango (especie nativa), sin embargo lo que se quiere hacer ahora para esta planta es optimizar y viabilizar la callogénesis como primera fase de un método de micropropagación masivo como es la embriogénesis somática indirecta que potencializa una vía rápida y más eficiente de multiplicación clonal, mejorando así los métodos tradicionales de multiplicación *in vitro* y *ex vitro* ahora existentes y aplicados para el guarango.

METODOLOGÍA

Localización geográfica:

Este proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Micropropagación del Centro de Investigaciones Ambientales de Cununyacu (CIAC) de la Empresa Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas EPMMOP-Q, situado en la provincia de Pichincha, parroquia Cumbayá, latitud: 0°20' S, longitud: 78°30' W a una altura de 2 200 m.s.n.m.

Procedimiento:

Previo a la desinfección, se realizó un lavado con una solución de 200ml agua con 2 gramos de detergente comercial por cada 30 semillas durante 40 minutos con agitación constante en un shaker (Innova-2100) y a continuación se realizó un triple enjuague con agua destilada. Debido a que la testa de las semillas maduras de guarango es dura se procedió a realizar un proceso de escarificación con cautín en la zona del micrópilo.

A la semilla se procedió a retirar la testa utilizando un bisturí, luego se separó los cotiledones del eje embriogénico.

Fase 1: Desinfección de los explantes

Para conseguir la asepsia de los explantes utilizados se aplicaron 4 tratamientos para la desinfección, que se centraron en soluciones de hipoclorito de sodio NaClO con 4 gotas de Tween® 80 a dos diferentes concentraciones y dos tiempos de inmersión.

Tabla 1: Tratamientos de desinfección para cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*.

TRATAMIENTOS PARA DESINFECCIÓN		
Ensayos	Hipoclorito de sodio (NaClO) (v/v) %	Tiempo (min)
1	0.5	5
2	1.5	5
3	0.5	10
4	1.5	10

Fase 2: Ensayo preliminar de inducción a callo embriogénico

Al haber determinado el mejor método de desinfección se procedió a plantear un ensayo preliminar de inducción a callo embriogénico a partir de cotiledones y ejes embriogénicos basado en investigaciones relacionadas: (Buendía *et al.*, 2003), (Marinucci *et al.*, 2004), (Gómez *et al.*, 2006) y (García *et al.*, 2006). Para posteriormente instalar un ensayo final a partir de los mejores resultados arrojados del ensayo preliminar de inducción.

Tabla 2: Dosificación de bioreguladores en medio de cultivo MS y Gamborg B5 para los ensayos preliminares de inducción a callo a partir de cotiledones y de ejes embriogénicos de árboles de *Caesalpinia spinosa*

TRATAMIENTOS PRELIMINARES DE INDUCCIÓN		
Medio	Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg.L ⁻¹)
MS	Control 1	-
	T1	2, 4-D (2 mg.L ⁻¹) + Kin (1 mg.L ⁻¹)
	T2	2, 4-D (1 mg.L ⁻¹) + BAP (0.5 mg.L ⁻¹)
	T3	TDZ (0.2 mg.L ⁻¹) + AIA (0.05 mg.L ⁻¹)
Gamborg B5	Control 2	-
	T4	2, 4-D (2 mg.L ⁻¹) + Kin (1 mg.L ⁻¹)
	T5	2, 4-D (1 mg.L ⁻¹) + BAP (0.5 mg.L ⁻¹)
	T6	TDZ (0.2 mg.L ⁻¹) + AIA (0.05 mg.L ⁻¹)

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: 6-bencilaminopurina; Kin: kinetina; AIA: ácido indol-acético y TDZ: thidiazuron.

Fase 3: Ensayo final de Inducción a callo embriogénico

Luego de evaluar los resultados conseguidos en el ensayo preliminar de inducción el explante en el cual se generó resultados positivos para callogénesis fue únicamente en el cotiledón. Así se pudo seleccionar los dos mejores tratamientos empleados que generaron la mayor presencia de callo viable y con ellos se procedió a montar el ensayo final de inducción, probando tres niveles de concentraciones de las combinaciones de los reguladores de crecimiento en el respectivo medio de cultivo, de manera ortogonal, incluyendo los tratamientos originarios.

Tabla 3: Dosificación de las concentraciones y combinaciones de bioreguladores para los ensayos concluyentes de inducción a callo a partir de cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*.

TRATAMIENTOS FINALES DE INDUCCIÓN		
Medio	Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mgL ⁻¹)
MS	Control 1	-
	T1	2, 4-D (1 mg.L ⁻¹) + Kin (0.5 mg.L ⁻¹)
	T2	2, 4-D (2 mg.L ⁻¹) + Kin (1 mg.L ⁻¹)
	T3	2, 4-D (4 mg.L ⁻¹) + Kin (2 mg.L ⁻¹)
	Control 2	-
	T4	TDZ (0.1 mg.L ⁻¹) + AIA (0.025 mg.L ⁻¹)
	T5	TDZ (0.2 mg.L ⁻¹) + AIA (0.05 mg.L ⁻¹)
	T6	TDZ (0.4 mg.L ⁻¹) + AIA (0.10 mg.L ⁻¹)

Fase 4: Identificación de callo embriogénico

Completado la etapa de inducción a callo se procedió a la identificación de viabilidad de los callos mediante su particular macro-morfología, como el color y la textura (Rodríguez *et al.*, 2005), utilizando para la identificación la ayuda de un estereoscopio (Olympus).

Una vez identificados los callos con características viables a callo embriogénico se procedió a realizar el análisis histológico que consistió en un frotis de una muestra de dichos callos viables aproximadamente 0.5 mm. Las placas fueron teñidas con una solución de acetocarmín al 2% (p/v) por 15 segundos, en seguida, se realizó un lavado del exceso de tinción con agua destilada, y finalmente se observó directamente en el microscopio óptico (Olympus CX31) dentro de la cámara de flujo laminar (Streamline), permitiendo así la identificación de estructuras embriogénicas (Vega & Prehn, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1: Desinfección de los explantes

El mejor tratamiento de desinfección para el caso de los cotiledones fue el T3 (NaClO al 0,5% durante 10 minutos + 4 gotas de Tween 80) presentando un porcentaje de 90% de explantes vivos, mientras que para el caso de los ejes embriogénicos, el tratamiento que mejor resultados presentó fue T1 (NaClO al 0,5% durante 5 min + 4 gotas de Tween 80) con un porcentaje de 96,7% de explantes vivos, pudiéndose evidenciar que para ambos casos la baja concentración de hipoclorito de sodio dio resultados favorables a la desinfección de los dos explantes.

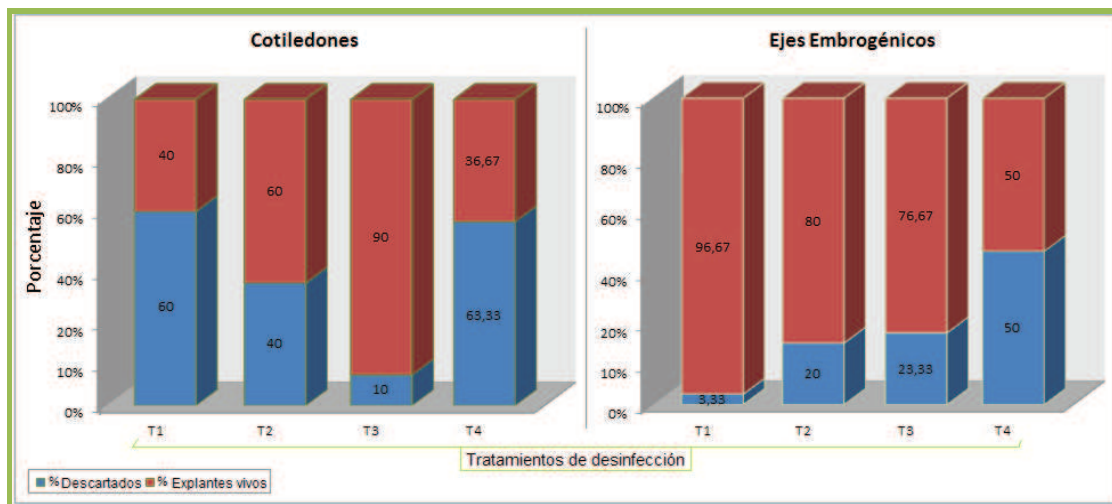
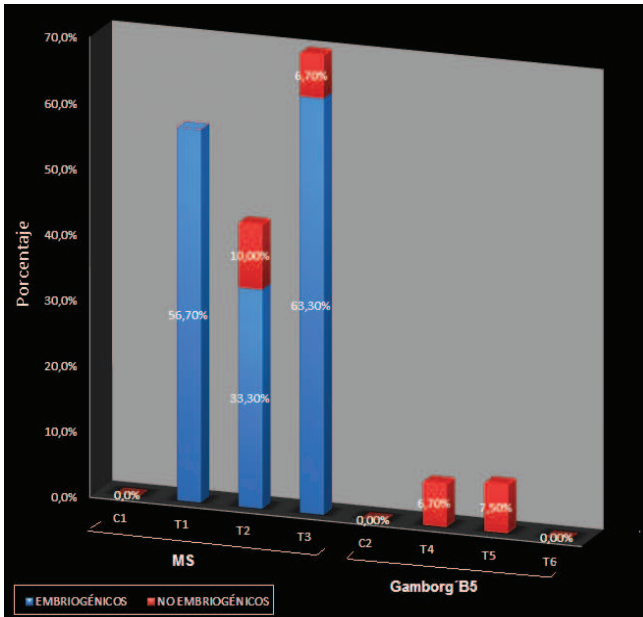


Figura 1: Porcentajes de cotiledones y ejes embriogénicos vivos y descartados, evaluados a los 25 días de haber sido establecidos.

Fase 2: Ensayo preliminar para la inducción a callo

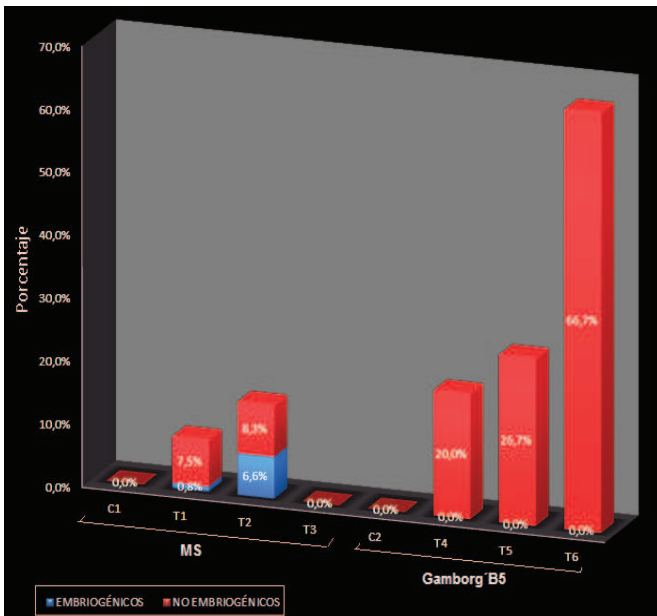
Cotiledones



Se identificó dos tratamientos que se destacaron en la formación de callo embriogénico, el primero T3 (MS: TDZ (0,2 mg.L⁻¹) + AIA (0,05 mg.L⁻¹)) con un 73,3% de formación total de callo, del cual el 63,3% fue callo embriogénico y el 6,7% no embriogénico. El segundo tratamiento en cotiledones que mostró buenos resultados en la formación de callo fue el T1 (MS: 2, 4-D (2 mg.L⁻¹) + Kin (1 mg.L⁻¹)) mostrando un porcentaje alto de formación de callo embriogénico de 56,7%.

Figura 2: Porcentajes de callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días.

Ejes embriogénicos



Dos tratamientos originaron la formación de callo embriogénico pero en porcentajes bajos el T2 (MS: 2,4-D (1 mg.L⁻¹) + BAP (0,5 mg.L⁻¹)) presentó un porcentaje de 6,6% de callos embriogénicos y el T1 (MS: 2, 4-D (2 mg.L⁻¹) + Kin (1 mg.L⁻¹)) mostró un 3,3% de callos embriogénicos.

Figura 3: Porcentajes de callos embriogénicos y no embriogénicos en ejes e., evaluados a los 60 días.

Fase 3: Ensayo final para la inducción a callo

Formación de callo en cotiledones

A excepción del tratamiento control C1, todos los tratamientos aplicados en la inducción presentaron callos formados, de ellos el tratamiento T3 (MS: 2,4-D (4 mg.L⁻¹) + Kin (2 mg.L⁻¹)) mostro un 100% de callos formados, en segunda instancia el tratamiento T5 (MS: TDZ (0,2 mg.L⁻¹) + AIA (0,05 mg.L⁻¹)) presentó un 76,7% de callos formados y en tercer instancia el tratamiento T2 (MS: 2,4-D (2 mg.L⁻¹) + Kin (1 mg.L⁻¹)) que mostró un porcentaje del 60,0% en la formación de callo.

En analogía con éste estudio, García y sus colaboradores en el 2006, expusieron que en semillas maduras de *Phaseolus vulgaris* L. los callos formados presentaron un mayor crecimiento en la medida que se incrementaron las concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo MS, además el abundante crecimiento de los callos puede deberse indirectamente a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre las auxinas (Jiménez, 2001).

Tabla 4 Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la formación, ausencia de callo y callos descartados en cotiledones, evaluados a los 60 días.

Medio	Tratamientos finales inducción		Condición			Total
	Reguladores de Crecimiento		Formación de callo	Ausencia de callo	Descartados	
MS	C1	Frec	0	29	1	30
		%	,0%	96,7%	3,3%	100,0%
	T1	Frec	4	25	1	30
		2,4-D (1 mgL ⁻¹) + Kin (0,5 mgL ⁻¹) %	13,3%	83,3%	3,3%	100,0%
	T2	Frec	18	12	0	30
		2,4-D (2 mgL ⁻¹) + Kin (1 mgL ⁻¹) %	60,0%	40,0%	,0%	100,0%
	T3	Frec	30	0	0	30
		2,4-D (4 mgL ⁻¹) + Kin (2 mgL ⁻¹) %	100,0%	,0%	,0%	100,0%
	T4	Frec	12	18	0	30
		TDZ (0,1mgL ⁻¹) + AIA(0,025mgL ⁻¹) %	40,0%	60,0%	,0%	100,0%
	T5	Frec	23	7	0	30
		TDZ (0,2 mgL ⁻¹) + AIA(0,05 mgL ⁻¹) %	76,7%	23,3%	,0%	100,0%
	T6	Frec	5	25	0	30
		TDZ (0,4 mgL ⁻¹) + AIA(0,10 mgL ⁻¹) %	16,7%	90,0%	,0%	100,0%
Total	Frec	92	146	2	210 (100%)	
	%	38,3%	60,8%	,8%		
Chi-cuadrado de Pearson			98,694*			

Tiempo de formación de callo

El tiempo de formación de callo se destacó a los 45 días de evaluación con un porcentaje general de 63% de callos formados y en segunda instancia a los 60 días de evaluación con un porcentaje de 37%.

Uno de los principales factores que influyen en el tiempo de formación de callo es la cantidad de nutrientes por lo que el aporte de todos los compuestos al medio de cultivo tiene que realizarse dentro de un rango más o menos amplio en función del compuesto en concreto y del cultivo *in vitro* a realizar (Marinucci *et al.*, 2004).

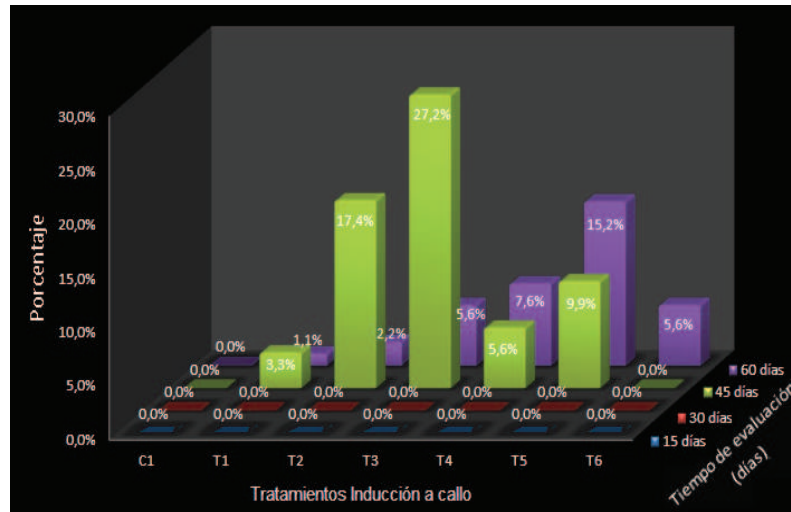


Figura 4: Porcentajes de callo formados en cotiledones a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo.

Morfología de los callos

Con los datos morfológicos obtenidos de los callos formados se realizó un análisis cluster jerárquico, donde se confirmó la formación de tres cluster o conglomerados, de los cuales el cluster 1 reunió a cinco de los siete tratamientos aplicados que presentaron callos de tipo embriogénico es decir friables y translúcidos, el cluster 2 reunió al tratamiento T6 que presentó callos compactos de color café con brotes adventicios de color verde que promueven el desarrollo de la caulogénesis y el cluster 3 conglomeró al control que fueron los explantes que no generaron callo.

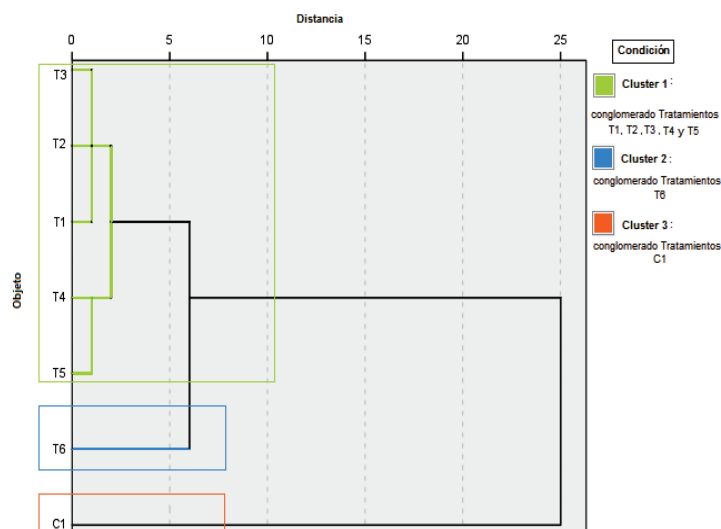


Figura 5: Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los cotiledones, por combinación de conglomerados re-escalados.

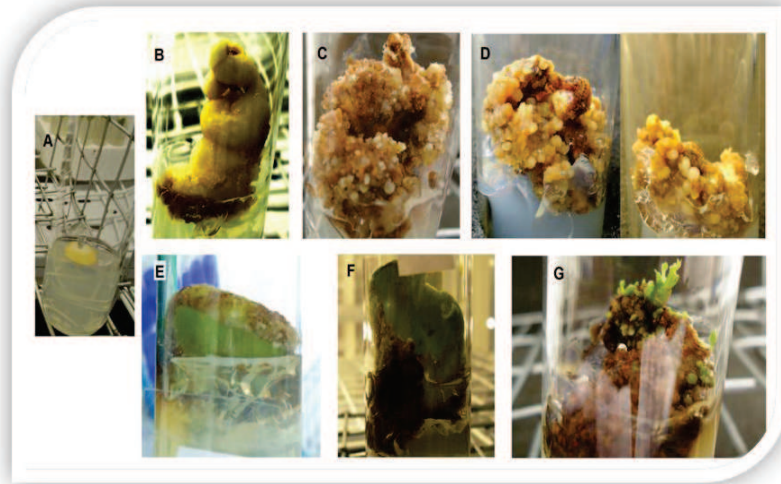


Figura 6: Fotografías de los callos formados en cotiledones: A) tratamiento control, ausencia de callo, B) callo con parte friable - translúcido del tratamiento T1, C) callo friable - translúcido del tratamiento T2, D) vista anterior y posterior del callo friable – translúcido del tratamiento T3, E) y F) callos con parte friable – translúcido del tratamiento T4 y T5 respectivamente, G) callo compacto - verde con presencia de brotes del tratamiento T6.

Una vez obtenidos los resultados del porcentaje de formación de callo en cada tratamiento de inducción y de la conglomeración de las características morfológicas se puede observar en la Figura 7 que tratamiento y cuantos de los callos formados fueron embriogénicos o no embriogénicos. Se destacó el T3 (MS: 2,4-D (4 mg.L⁻¹) + Kin (2 mg.L⁻¹) el cual fue el que presentó mayor porcentaje de callos embriogénicos con un 100% del total de callos sembrados.

El uso de estos dos reguladores (2,4-D + Kin) se aplicó en la investigación de Gómez, *et al.*, (2006) en *E. globulus* dando como resultado callos translúcidos, friables y con zonas de color amarillo a café, características que se han atribuido a comportamiento embriogénico en especies leñosas (Rodríguez *et al.*, 2005).

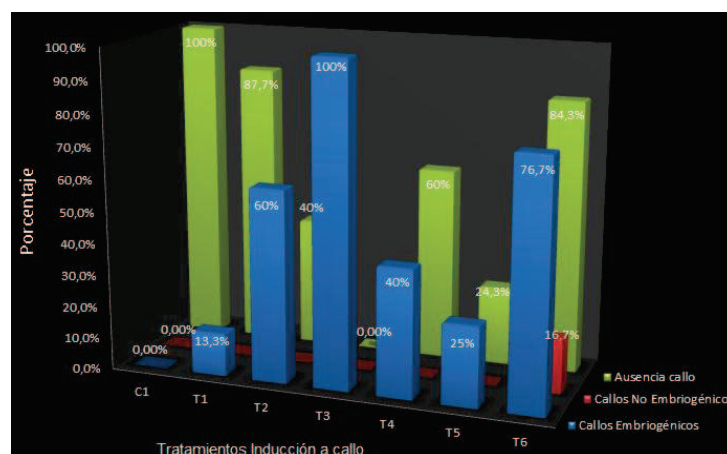


Figura 7: Porcentajes de callos embriogénicos, no embriogénicos y ausencia de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 60 días.

Fase 4: Análisis histológico de los callos embriogénicos

Se efectuó un análisis micro-morfológico de los callos embriogénicos y de manera general en los frotis se pudo observar pro-embriones, células embriogénicas, que presentaron: un citoplasma denso, núcleos teñidos fuertemente y glicoproteínas de color rojo intenso. Las células no embriogénicas presentaron menor intensidad de color, estas estructuras coinciden con las visualizadas en frotis de los callos originados a partir de hojas de *Psychotria acuminata* identificadas por Lara, *et al.*, (2003) donde se evidenció una capa conformada por células pequeñas con núcleos grandes y citoplasma denso. Estas células mitóticamente activas se tiñen más intensamente debido a una mayor cantidad tanto de ácidos nucleicos como de proteínas.



Figura 8: Corte histológico de callo (tratamiento T3) mostrando posibles (CNE), célula no embriogénica. Posible célula embriogénica (CE); pro-embrión (Pe) núcleo (n), citoplasma denso (Ci) y pared celular primaria engrosada rodeando esta célula (pcp), (objetivo 100X).

CONCLUSIONES

- Los mejores resultados para la desinfección de cotiledones se obtuvo del tratamiento T3 aplicando una solución de NaClO al 0,5% (v/v) más cuatro gotas de Tween 80 por un periodo de 10 minutos con una proporción de 90% de explantes vivos.
- Los mejores resultados para la desinfección de ejes embriogénicos se consiguió del tratamiento T1 que consistió en una solución de NaClO al 0,5% (v/v) más cuatro gotas de Tween 80 por un periodo de 5 minutos con una proporción de 96,7% de explantes vivos.
- Los mejores explantes para lograr una proporción del 100% en la formación de callo embriogénico se produjo a partir de cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*.
- El mayor porcentaje de formación de callo (calogénesis *in vitro*) en cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* ocurrió al utilizar el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) al total de su concentración.

- Posiblemente el incremento de las concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4 Diclorofenoxiacético de 2 mg.L^{-1} a 4 mg.L^{-1} y de Kinetina de 1 mg.L^{-1} a 2 mg.L^{-1} aumentó el porcentaje en la formación de callo embriogénico a partir de cotiledones de 60% a 100%.
- La mejor respuesta para la obtención de callo embriogénico a partir de cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* fueron: medio basal Murashige & Skoog al total de su concentración, 3 g.L^{-1} de sacarosa, 0,65% de agar, 4 mg.L^{-1} de 2,4 D y 2 mg.L^{-1} de Kin a los 45 días como tiempo de inducción.
- La morfología más importante que presentaron los callos de tipo embriogénico en cotiledones de *Caesalpinia spinosa* fue: callos translúcidos y de textura friable.
- El tejido embriogénico de los callos formados a partir de cotiledones semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* presentó pro-embriones, células embriogénicas en división celular (mitosis), que contenían citoplasma denso, núcleos y glicoproteínas.

BIBLIOGRAFÍA

Buendía L., Sandoval E., Chávez V., J. Vernon E. & Cruz F. (2003). Inducción de embriogénesis somática en *Prosopis laevigata*. Dpto. de Biotecnología, Dpto. de IPH, UAM-Iztapalapa. Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.

García, L., Pérez, J., Torres, D., Padrón, Y. & Romero, C. (2006). Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247. Biotecnología Vegetal 6 (2), 73 - 77.

Gómez, C., Uribe, M., Ríos, D. & Sánchez, M. (2006). INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN *Eucalyptus globulus* Labill. INCI 31 (10), 734-738.

Jiménez, V. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal 13 (2), 196 – 223.

Hernández, M., Hidrobo, J., & Araujo, B. (1999). Proceso de Embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum*, L.). En: Memorias del IX Seminario Científico del INCA, San José de las Lajas, p. 12-13.

Lara, A., Valverde, R. Gómez, L.(2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. Agronomía Costarricense 27(1), 37-48.

Mancero, L. (2008). La Tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Regional ECOBONA - INTERCOOPERATION, Quito. p. 13 – 35.

Marinucci L., M. Ruscitti M. & Abedini W. (2004). Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, 105 (2), 27-36.

Narváez-Trujillo, A., Calvo, A. & Troya, M. (2009). “Las poblaciones naturales de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos a través de estudios moleculares y bioquímicos”. Serie Investigación y Sistematización, 7. Programa Regional ECOBONA INTERCOOPERATION, Laboratorio de Biotecnología Vegetal Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito. p. 5 – 12.

Reinert, J. (1958). Studies on morphogenesis in tissue cultures. Ver. Dtsch. Bot. Ges. 71, 15-24.

Rodríguez, R., Álvarez, C., Centeno, M., Berros, B. & Rodríguez, A. (2005). Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. En Sánchez M, Ríos D (Eds.) *Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Chile. p. 63-67.

Steward, F., Mapes, M., Y Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. American Journal of Botany. 45, 705-708.

Vázquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M., & Cervantes, V. (1997). La reproducción de las plantas: semillas y meristemos. Fondo de cultura económica. Primera edición México, D.F. ISBN 968-16-5376-9. Impreso en México.

Vega, A., & Prehn, D. (2005). Inducción e Inicio de Maduración *In vitro* de Tejido Embriogénico de *Quillaja saponaria*. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.p. 198-208.