

Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática

Raúl Barbón Rodríguez

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: raul@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

En el presente trabajo se realiza una breve reseña sobre la influencia del ambiente *in vitro* en el proceso morfogénico de la embriogénesis somática, específicamente el efecto que tienen determinados gases que se acumulan en la fase gaseosa de los frascos de cultivo como son el oxígeno, el dióxido de carbono y el etileno sobre la embriogénesis somática. Se hace referencia también a biomoléculas como las proteínas, isoenzimas, poliaminas y arabinogalactanoproteínas que están relacionadas con el proceso morfogénico de la embriogénesis somática.

Palabras clave: ambiente *in vitro*, Embriogénesis somática, embrión somático, marcadores moleculares

ABSTRACT

In the current work, a review on the influence of the *in vitro* environment in the morphogenetic process of the somatic embryogenesis is carry out, specifically the effect of certain gases accumulated in the gas phase of the culture vessel; such as oxygen, dioxide of carbon and ethylene on the somatic embryogenesis. A reference to biomolecules such as proteins, isoenzyme, polyamine and arabinogalactano proteins which are related with the morphogenetic process of the somatic embryogenesis is also made.

Key words: *in vitro* environment, molecular markers, Somatic embryogenesis, somatic embryo

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática *in vitro* fue desarrollada por primera vez a partir de callos de zanahoria (*Daucus carota* L.) por Reinert en 1958. Este hecho constituyó el punto de partida para que en los últimos 40 años se lograra inducir la embriogénesis somática en más de 200 especies de diferente origen filogenético, tanto de plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas.

La embriogénesis somática está llamada a ser dentro de poco tiempo la nueva vía de propagación masiva para diferentes especies de plantas porque brinda una serie de ventajas como es la obtención de volúmenes de producción superiores en un menor periodo de tiempo y a un costo más bajo con respecto a la propagación por organogénesis. Sin embargo, a pesar de haberse descrito la embriogénesis en un gran número de especies, todavía es necesario un mayor estudio básico de la embriogénesis somática y de las bases bioquímicas de la misma (Shimazu y Kurata, 1999) que permitan incrementar la eficiencia y repetibilidad de estos sistemas.

Continuamente se introducen nuevas especies de interés agrícola como modelos que contribuyen a profundizar aún más en la morfogénesis vía embriogénesis somática.

El estudio y la optimización de la embriogénesis somática se ha centrado en los últimos tiempos en los componentes fundamentales del medio de cultivo, prestándosele poca atención a la atmósfera gaseosa dentro del frasco de cultivo (Auboiron *et al.*, 1990).

Dentro de las variables físicas que conforman el ambiente *in vitro*, el efecto del oxígeno disuelto en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas ha sido el más estudiado en diferentes cultivos como *Picea abies* (Kvaalen y Arnold, 1991), *Daucus carota* (Jay *et al.*, 1992; Shigeta *et al.*, 1996; Shimazu y Kurata, 1999), *Cyclamen persicum* (Hohe *et al.*, 1999), *Oryza sativa* L. (Okamoto *et al.*, 1996), café (Jiménez *et al.*, 1995; de Faria, 2000). Sin embargo muy poca atención se le ha prestado a la influencia de otros componentes del ambiente físico *in vitro* sobre la embriogénesis somática como son el dióxido de carbono y el etileno.

Los estudios del efecto del CO₂ en el cultivo *in vitro* se han concentrado en el mejoramiento y optimización de la propagación de plantas vía organogénesis en cultivos mixotróficos y autotróficos bajo condiciones controladas (Kozai *et al.*, 1996; Niu *et al.*, 1996). Los estudios que se comienzan sobre el efecto del CO₂ sobre la embriogénesis somática se basan en la fisiología de los embriones cigóticos en la semilla botánica, donde hay una disminución paulatina del oxígeno y un aumento del dióxido de

carbono (Miyoshi y Sato, 1997). Con el desarrollo de la embriogénesis somática en diferentes cultivos y las ventajas que esta brinda en relación con la organogénesis, se han comenzado los estudios sobre el efecto del CO₂ (Hohe, 1999, Hohe *et al.*, 1999) y otros gases como el etileno (Auboiron *et al.*, 1990), con el objetivo de optimizar el proceso y aumentar la calidad de los embriones somáticos obtenidos.

El monitoreo y control de variables físico-químicas en los biorreactores ha permitido dilucidar aspectos positivos de la atmósfera gaseosa para optimizar procesos embriogénicos tanto de especies de interés agrícola como ornamentales (Preil *et al.*, 1998; Hohe, 1999). Se han realizado pocos estudios sobre los sistemas de producción de embriones somáticos empleando biorreactores (Preil *et al.*, 1988; Cazzulino *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1991; Denchev *et al.*, 1992; Harrell *et al.*, 1994 y Ibaraki *et al.*, 1995). Sin embargo, en estos sistemas al igual que en los frascos de cultivo el efecto de los diferentes factores del ambiente físico continúan sin investigarse profundamente.

El desarrollo de la bioquímica y la biología molecular en plantas ha permitido identificar moléculas relacionadas con los procesos de diferenciación celular (Van Engelen y de Vries, 1992; Samaj *et al.*, 1999; Saare-Surminski *et al.*, 2000) y se puede destacar el papel de poliaminas, isoenzimas y proteínas como las glicoproteínas y las arabinogalactanoproteínas (AGPs) en la inducción y regeneración de embriones somáticos (De Vries, 1988; Meijer *et al.*, 1999).

El ambiente físico en el cultivo *in vitro*

El ambiente *in vitro* se caracteriza por alta humedad relativa, una temperatura constante, bajo nivel de densidad de flujo de fotones fotosintéticos, fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar, sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, la acumulación de sustancias tóxicas y la ausencia de microorganismos. Estas condiciones por lo general causan bajos niveles de transpiración, de absorción de agua, nutrientes y de CO₂; pero un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que resulta en un pobre crecimiento celular. Kitaya *et al.* (1998) afirmó que un microambiente controlado promueve el crecimiento y desarrollo de plantas, reduce los desordenes morfológicos y fisiológicos, y estimula rápidamente el crecimiento de plantas vigorosas.

El ambiente físico influye en el crecimiento y desarrollo morfogénico del tejido *in vitro* (Nguyen y Kozai, 1998; Kozai *et al.*, 1996). La atmósfera gaseosa en el frasco de cultivo con determinado material vegetal en sus inicios está compuesto principalmente de N₂ (78.0%), O₂ (21.0%) y CO₂ (0.035%). La composición del gas en el frasco de

cultivo está influenciada por el volumen del vaso de cultivo y la magnitud de la ventilación. El etanol, los acetoaldehídos y el etileno, así como otros hidrocarburos son componentes adicionales de la atmósfera gaseosa *in vitro* (Ziv, 1995). Los factores más notables son el CO₂, O₂, etileno, temperatura y humedad relativa.

Papel del dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo

Debido a la limitación del intercambio gaseoso en los frascos de cultivo, la concentración de CO₂ en los vasos de cultivo inoculados con tejidos clorofílicos decrece lentamente dos horas posteriores al comienzo del fotoperíodo, alcanza una concentración estable pero significativamente menor que la concentración de CO₂ en condiciones normales (0.035%), pero es mucho mayor con respecto al punto de compensación (0.005-0.010% CO₂) al final del fotoperíodo (Hayashi *et al.*, 1993). La micropropagación fotoautotrófica tiene sólo efectos beneficiosos para el cultivo tejidos clorofílicos los cuales tienen un balance de CO₂ positivo durante el fotoperíodo a una concentración de 0.035% o mayores (Jeong *et al.*, 1993). Niu *et al.* (1996) y Niu y Kozai (1997) desarrollaron modelos para predecir el nivel de fotosíntesis y concentración de CO₂ en los frascos de cultivo para plantas de *Cymbidium* y *Solanum tuberosum* L. Se ha observado el efecto positivo del CO₂ sobre la morfogénesis vía organogénesis en algunos cultivos como *Ipomea batatas* (Heo y Kozai, 1999; *Brassicca oleracea* (Zobayed *et al.*, 1999) y *Solanum tuberosum* L. (Niu *et al.*, 1997).

En una mezcla homogénea, la presión parcial de dióxido de carbono en la fase líquida está en equilibrio con la fase gaseosa y puede ser, por lo tanto, fácilmente determinada en el gas de salida. Hace pocos años que se han comenzado a emplear electrodos esterilizables para determinar la presión parcial de CO₂ en medios de cultivos líquidos en investigaciones con suspensiones celulares (Preil *et al.* 1998).

Los efectos del CO₂ sólo están señalados principalmente para plantas *in vitro* bajo condiciones autotróficas, heterotróficas o mixotróficas Niu *et al.*, 1996, (Kozai *et al.*, 1997, Kitaya *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 1999) y para cultivo de suspensiones celulares usadas para la producción de metabolitos secundarios (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

Todavía no hay suficiente información precisa sobre el papel del CO₂ en la embriogénesis somática con el empleo de suspensiones celulares (Preil y Beck, 1991; Hohe, 1999). En experimentos con suspensiones no embriogénicas de *Catharanthus roseus* se llegó a la conclusión de que este cultivo es muy sensible al CO₂ disuelto y el crecimiento

celular se vio reducido a concentraciones por encima y por debajo de un intervalo óptimo (Hergarty *et al.*, 1986). Se ha señalado que el CO_2 es esencial para el crecimiento celular de las suspensiones y que la eliminación del mismo de la aireación es una causa fuerte que propicia la inhibición del crecimiento (Esashi, 1989).

Kranz (1988), observó que sólo las células derivadas de la fase estacionaria en un sistema de cultivo de suspensiones celulares cerrado de nabo (*Brassica napus* L.) fueron un inóculo adecuado para la inducción de la embriogénesis somática. Se estima que los requerimientos de CO_2 que no están implicados con un proceso de fotosíntesis deben estar relacionados con alguna que otra vía metabólica en la biosíntesis de aminoácidos. Según Preil (1991), los altos resultados obtenidos en erlenmeyers con respecto a las biorreactores fue debido a la diferencia en la atmósfera gaseosa de ambos frascos de cultivo.

El papel del oxígeno en el cultivo *in vitro*

La concentración de oxígeno tiene un efecto sobre la fotorespiración de plantas C_3 . A concentraciones normales de O_2 , las plantas C_3 *ex vitro* pierden hasta el 50.0% del CO_2 fijado por fotosíntesis debido a la fotorespiración. Sin embargo esta pérdida de CO_2 es suprimida a bajas concentraciones de O_2 .

La concentración de O_2 en el frasco de cultivo decrece paralelamente con el incremento de la concentración de CO_2 (Doi *et al.*, 1989). En *Caladium bicolor* (C3) decrece la concentración de CO_2 en el frasco de cultivo con el incremento del CO_2 , mientras que en *Dendrobium phalaenopsis* (CAM), decrece la concentración de oxígeno en mayor proporción que el incremento de la concentración de CO_2 . Esto indica que los cambios en el consumo y producción de CO_2 dependen del tipo de fijación de CO_2 de la planta en cuestión (Fujiwara y Kozai, 1995).

El etileno en el cultivo *in vitro*

Es conocido que el gas etileno (C_2H_4) causa numerosas influencias hormonales en las plantas. Las concentraciones de etileno y compuestos tóxicos (productos de la oxidación de fenoles) en la fase gaseosa de los frascos de cultivo poseen una tendencia al incremento durante el cultivo (Nguyen y Kozai, 1998). A diferencia del oxígeno y el CO_2 , el etileno es solamente liberado pero no absorbido por el tejido *in vitro* y por lo tanto, pudiera ser liberado del frasco de cultivo una vez acumulado. La vía para resolver este problema es incrementar el número de intercambios gaseosos del frasco de cultivo o el empleo de una ventilación forzada (Fujiwara y Kozai, 1995).

El ambiente físico *in vitro* y la embriogénesis somática

Muchos de los efectos del CO_2 , O_2 y C_2H_4 han sido descritos para el crecimiento de plantas *in vitro* (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994), pero poco se conoce sobre la influencia de la atmósfera gaseosa sobre el proceso de embriogénesis somática (Shimazu y Kurata, 1999).

El O_2 y el CO_2 son de importancia tanto para la embriogénesis cigótica como para la embriogénesis somática en algunas especies (Kvaalen y von Arnold, 1991). Hace más de 30 años, Kessel y Carr (1972) demostraron que en suspensiones celulares de zanahoria existía un desarrollo de la embriogénesis si la presión parcial de O_2 ($p\text{O}_2$) disminuía, mientras que la embriogénesis del cultivo de anteras podía ser inducida con elevadas concentraciones de CO_2 . Este gas a pesar de su conocido efecto positivo en la fotosíntesis de las plantas, también promueve el crecimiento en suspensiones celulares heterotróficas de *Caranthus roseus* (Ducos *et al.*, 1993).

Según Johansson y Eriksson (1984) es posible que se promueva la fijación en la oscuridad del CO_2 a elevadas concentraciones y mejore por esta vía el desarrollo de la embriogénesis somática en microsporas de *Papaver*. Señalaron también que en la especie *Clematis venticela* se estimuló la embriogénesis somática en cultivos de anteras cuando el tejido fue incubado a una concentración de dióxido de carbono de 2.0%, y se obtuvo un mayor rendimiento del número de embriones somáticos por explantes en medio de cultivo semisólido, al mantener el material vegetal durante 60 días bajo el efecto del CO_2 con respecto a otros explantes incubados durante un menor tiempo de cultivo. Según Ziv (2000) los requerimientos de CO_2 en procesos no fotosintéticos como es la embriogénesis somática, pudiera estar involucrado en determinadas vías metabólicas como es la biosíntesis de aminoácido.

Algunos autores plantean que es posible que la presión parcial de CO_2 estimule el crecimiento del tejido embriogénico (Kvaalen y von Arnold, 1991). Mientras que Ma *et al.* (1998) demostraron que la fijación de CO_2 en la oscuridad en callos de *Nicotiana tabacum* conduce a la acumulación de malato, el cual se cree juega un papel en la osmorregulación en la expansión celular entre las sucesivas divisiones celulares.

Experiencias realizadas por Hohe *et al.* (1999) demostraron un mejor crecimiento de suspensiones celulares de *Cyclamen persicum* en biorreactores a bajas concentraciones de dióxido de carbono, mientras que la obtención de embriones somáticos mejoró con altas concentraciones de CO_2 en la mezcla gaseosa.

El proceso de inducción y diferenciación de embriones somáticos está muy vinculado con el comportamiento de los pH del medio de cultivo y la concentración de CO_2 en el frasco de cultivo. Según George (1993) esto podría deberse a que:

- La concentración de CO_2 modifica el pH del medio de cultivo e influye sobre el proceso de embriogénesis somática.
- El CO_2 actúa como estimulador del proceso de embriogénesis somática a determinadas concentraciones y por tanto hay mayor consumo de nitrógeno en forma de amonio lo que hace disminuir el pH.
- Pudiera existir una combinación de las hipótesis anteriores.

Al estimular el CO_2 el proceso de diferenciación celular, pudiera existir una preferencia por el nitrógeno en forma de amonio en un medio de cultivo enriquecido con nitrógeno en forma de amonio y nitrato. Por su parte, George (1993), explica que a medida que el pH es menos ácido esta fuente de nitrógeno (NH_4^+) es más asimilable por los cultivos en suspensión y su consumo implica la liberación al medio de cultivo de protones H^+ lo que provoca una disminución en los valores de pH, condición esta (acidez del medio de cultivo) que favorece la absorción del nitrógeno en forma de nitrato, resultando en una liberación de iones (OH^-) al medio de cultivo y en consecuencia un gradual incremento en los niveles del pH, momento este que coincidió además con la formación de los primeros embriones somáticos en etapa globular. Comportamientos similares del pH han sido descritos para la fase de diferenciación suspensiones celulares de *Daucus carota* L. (Archambault *et al.*, 1995) y de *Coffea arabica* L. cv. Catimor (de Faria, 2000).

Smith y Krikorian (1990), al trabajar la diferenciación de células de zanahoria, pero en un medio de cultivo semisólido libre de reguladores del crecimiento, obtuvieron que con un pH cercano a 4.0 se mantuvo la proliferación y multiplicación de proembriones y sólo cuando el pH fue ajustado a un valor de 5.80, se observaron las restantes etapas de la embriogénesis somática para este cultivo.

También con el cultivo de la zanahoria Jay *et al.* (1994), observaron que a pH 4.30 los embriones somáticos no se desarrollaron más allá de la etapa de corazón, mientras que, a valores de 5.80 los embriones somáticos maduraron y dieron lugar a plantas más desarrolladas con grandes raíces y cotiledones verdes individualizados.

Es muy discutido el por qué de esa típica variación del pH. También Chen y Kao (1997) y Hvostef-Eide (2000) plantearon que la acidificación del medio de cultivo en los biorreactores fue debido a la asimilación de amonio al comienzo del cultivo y

un posterior incremento del pH por la activación de la enzima nitrato reductasa la cual produce la reducción del anión nitrato. Mientras que Preil *et al.* (1996), observaron que cuando el pH disminuyó en suspensiones celulares de *Cyclamen persicum*, la concentración de iones amonio y nitratos se mantenía alta (78 y 79%) y disminuían paralelamente. Según Sakano *et al.* (1997), la disminución del pH podría ser debido a la asimilación de iones potasio y la inducción de las enzimas malatosintetasa y citratosintetasa, lo cual provoca cambios en el pH citoplasmático lo cual conduce a la activación de la bomba de protones y la liberación de protones hacia el medio de cultivo e incorporación de iones potasio al interior celular.

La diferenciación y germinación de los embriones somáticos parecen ser inhibidos por el etileno (Biddington, 1992; Merkle *et al.*, 1995). De hecho, la adición de inhibidores de la síntesis de etileno, como cobalto, níquel (Roustan *et al.*, 1989), y el ácido salicílico (Roustan *et al.*, 1990), activan la embriogénesis somática en *Daucus carota* L. Sin embargo, en el caso de *Medicago sativa* L., la maduración de los embriones somáticos requiere de la presencia de etileno (Merkle *et al.*, 1995).

La embriogénesis somática puede ocurrir bajo diferentes regímenes de luz y/o oscuridad (Thorpe, 1988); una intensidad luminosa alta es esencial para obtener embriones somáticos en *Nicotiana tabacum* L. Sin embargo, la embriogénesis somática se favorece generalmente mediante incubación en la oscuridad continua (Ammirato, 1987); en *Daucus carota* L. (Ammirato y Steward, 1971) y *Manihot sculenta* Crantz (Szabados *et al.*, 1993) se emplea la oscuridad para el desarrollo y maduración normal de los embriones somáticos.

Por otra parte, durante la germinación, es necesario el control de la intensidad de luz y el fotoperiodo.

Los pretratamientos con frío pueden ser beneficiosos para la embriogénesis somática (Thorpe, 1988), y se han empleado rutinariamente para estimularla en cultivos de anteras en *Juglans regia* L. y *Vitis* spp. (Nitsch, 1974).

Aspectos moleculares de la embriogénesis somática

De la embriogénesis somática se han estudiado sus aspectos morfológicos y algunos fisiológicos pero los mecanismos moleculares que determinan y controlan el proceso son poco conocidos. Se ha determinado que ocurren cambios en la expresión de los genes al inducirse el desarrollo embriogénico, como es la síntesis de proteínas específicas del embrión somático (Sung y Okimoto, 1981), incremento en la actividad descarboxilasa orgánica (Montague, 1999), incremento en la actividad

enzimática en la vía pirimidínica (Ashihara *et al.*, 1981) y en el desarrollo de la capacidad para inactivar ciclohexamidas (Sung *et al.*, 1981).

Después de iniciada la embriogénesis somática por factores externos como la presencia de 2,4-D, ocurre la reprogramación de la expresión génica. Este proceso génico es responsable de la ocurrencia normal de esta vía de desarrollo en las plantas. Una clasificación de los genes involucrados en la embriogénesis de acuerdo con las etapas del proceso fue realizado por Dure (1985):

- Genes que se expresan durante el desarrollo o constitutivos.
- Genes que se expresan sólo en embriones o específicos de embriones.
- Genes que se expresan durante la embriogénesis temprana.
- Genes que codifican para proteínas de semilla sin madurar.
- Genes que se expresan durante la embriogénesis tardía antes de germinar la semilla.

Según de Vries *et al.* (1988), no existen en explantes de zanahoria (*Daucus carota* L.) células competentes para formar embriones. Estas adquirieron la competencia 19 días después de iniciado el proceso de cultivo en un medio de cultivo que contenía 2,4-D. El óptimo de la capacidad embriogénica fue adquirido después de 50 días de iniciado el cultivo. La adquisición del potencial embriogénico en cultivos en fresco es acelerada adicionando al medio de cultivo un medio condicionado libre de células o cocultivo para establecer cultivos embriogénicos (Veisseire *et al.*, 1994 y Meijer *et al.*, 1999). El análisis del medio condicionado ha revelado que proteínas extracelulares son secretadas por células embriogénicas en el medio de cultivo, las cuales actúan como marcadores moleculares para distinguir entre cultivos embriogénicos y no embriogénicos.

Proteínas

En los últimos años se han reconocido algunos marcadores moleculares que indican la transición de células somáticas a células embriogénicas; además de alrededor de 21 genes específicos o relacionados con la embriogénesis han sido clonados a partir de embriones somáticos (Zimmerman, 1993). En 1987, Choi *et al.* describieron el aislamiento de genes los cuales se expresaban durante la embriogénesis somática, así como el conocimiento de su función mediante técnicas de biología molecular. Estos genes son los denominados LEA (Late Embryogenesis Abundant), los que se regulan por la vía metabólica del ácido abscísico y se expresan durante la embriogénesis tardía, así como el caso de *dc₃* y *EMB-₁* (Wurtele *et al.*, 1993) y *dc₈* (Hatzapoulos *et al.*, 1990). También se ha aislado el gen *ep₁*, exclusivo de células no embriogénicas (Van Engelen *et al.*, 1991). En cultivos celulares de *Medicago sativa* L. se encontraron dos proteínas análogas a la *ep-₁* que disminuyen considerablemente su concentración al

eliminar el 2,4-D el medio de cultivo (Poulsen *et al.*, 1996). Otro gen aislado es el *ep₂*, el cual codifica para una proteína que transfiere lípidos específicos de células embriogénicas de zanahoria (Sterk *et al.*, 1991), este gen codifica para una proteína no glicosilada de 10 kD, transportadora de monómeros de cutina a la cutícula (que se forma tan pronto aparece la protodermis del embrión), cuya función es prevenir el alargamiento celular en el ambiente hipotónico lo cual limita la entrada de agua en la célula; dichos monómeros pueden ser esterificados, una vez en la cutícula, para el crecimiento de la misma. La *ep-₂* se ha utilizado como indicador de la embriogénesis somática, además de en zanahoria, en uva (Contos-Thevenot *et al.*, 1992), alfalfa (Poulsen *et al.*, 1996) y *Saccharum* spp. (Rodríguez *et al.*, 1999).

Se ha confirmado la presencia de proteínas de 32 kD análogas a *ep-₃*, también relacionadas con la capacidad embriogénica en diversas especies, *Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. (Cevallos, 2000) y *Saccharum* sp (Rodríguez, *et al.*, 1999). En estas últimas especies se ha obtenido un anticuerpo policlonal (*a-PE32*) para la proteína análoga a *ep-₃* de caña de azúcar (*PE-32*) (Rodríguez *et al.* 1996), que también detecta proteínas de 32 kD asociadas a la embriogénesis somática en *Coffea canephora* P. y *Coffea arabica* L. (Cevallos, 2000).

Relacionado con la competencia embriogénica se ha aislado el gen *ep-₅*, el cual codifica para una peroxidasa catiónica de 38 kD, que recupera la competencia embriogénica de cultivos celulares bloqueada por tunicamicina antes de la adquisición del etapa globular de los embriones somáticos, y que podría actuar en el proceso embriogénico reduciendo la extensibilidad de la pared celular (Cordewener *et al.*, 1991).

Recientemente se han aislados otros genes en zanahoria, muchos de los cuales se encuentran todavía en estudio, como el gen *chb₁* que se expresa en todas las etapas de la embriogénesis, el gen *chb₂* que se inhibe su expresión con la adición de 2,4-D, los genes *chb₄* y *chb₅* que se expresan en la etapa de torpedo y participan en la formación del hipocótilo y la raíz, y el gen *21d7* asociado a la división celular (Komamine, 1998); así como el gen que codifica para la proteína de los cuerpos lipídicos que conforman la membrana celular (Kawara y Komamine, 1995).

Se ha sugerido que la capacidad embriogénica de los tejidos en cultivo *in vitro* depende de su contenido en poliaminas libres (Beranger-Novat *et al.*, 1990). Se ha señalado en varios cultivos la posible importancia de los niveles de poliaminas (PAs) (Berros, 1996; Yadav y Radam, 1998) sobre inducción embriogénica en explantes, aunque tal dependencia podría estar relacionada con el tipo de tejido empleado

como explante, puesto que la capacidad embriogénica de secciones foliares de *Solanum melongena* L. parece depender del contenido de PAs (Yadam y Rajav, 1998). También parece ser un prerrequisito general para la embriogénesis somática el incremento de PAs durante la inducción embriogénica a partir de explantos o callos (Albrechtová *et al.*, 1994), aunque tal correlación puede ser inversa en algún sistema experimental como ocurre en callos nucelares de *Manguifera indica* L. (Litz y Schaffer, 1987), e incluso no existir en la embriogénesis a partir de cotiledones de *Solanum melongena* L.

Isoenzimas

De acuerdo con Moss (1982) se define como isoenzimas a las múltiples formas moleculares de una misma enzima que ocurren de una misma especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificando para cada una de ellas

La definición de las isoenzimas como marcadores moleculares ha sido controvertida, ya que algunos las denominan marcadores bioquímicos (Gepts, 1994) mientras que otros, considerando propiamente su base genética, las incluyen entre los marcadores moleculares (León, 1998). La utilidad de las isoenzimas como marcadores se encuentra bien documentada y las variantes genéticamente definidas de las isoenzimas han demostrado su importancia en la evaluación de la variabilidad de especies como arroz, maíz, frijol, papa, ajo, trigo y soya entre otras (Sánchez, 1999).

Las isoenzimas desempeñan una misma actividad catalítica, pero presentan diferentes movilidades electroforéticas, dadas por las diferencias en secuencias de aminoácidos y, en última instancia, como el resultado de las variaciones a nivel de las secuencias de ADN que codifican estas enzimas. Por ello se asume que estas diferencias poseen base genética y son heredables (Murphy *et al.*, 1990).

La caracterización de las estructuras embriogénicas y no embriogénicas es útil y necesaria para el establecimiento de diferencias bioquímicas, moleculares e histológicas entre ellas. Este paso es imprescindible para obtener un cultivo de células homogéneo, que permita futuras manipulaciones en las suspensiones celulares (Noualle y Periar, 1988; Ganaprasadam y Vasil, 1992).

Uno de los principales enfoques experimentales abordados ha sido el establecer puntos de comparación entre los tipos celulares en una suspensión. Se han hallado diferencias al comparar células embriogénicas y no embriogénicas en cultivos celulares de zanahoria (Wurtele *et al.*, 1988). El contenido de almidón ha sido mayor en las células embriogénicas, lo que sugiere la posibilidad de que sea degradado más rápidamente en las células no

embriogénicas. Otro ejemplo es la G-ADP fosforilasa, aunque su actividad resulta similar en ambos tipos de células, los resultados señalan que se trata de isoenzimas distintas, ya que su movilidad e hibridación fueron diferentes para los tejidos embriogénicos y no embriogénicos. En la etapa globular y corazón hay un aumento en la síntesis de lípidos, ocurriendo también cambios en el contenido de ácidos grasos en las etapas tempranas del desarrollo del embrión somático (Thompson y Thorpe, 1989).

El aspecto bioquímico estudiado como posible marcador de la embriogénesis somática es el patrón electroforético de proteínas, antes y durante el desarrollo del embrión somático (Slay *et al.*, 1989; Kioyosue *et al.*, 1991). Aún cuando difieren los resultados, está claro que existen diferencias notables en algunos casos entre los tejidos embriogénicos y los que no lo son, para diferentes enzimas. Se ha determinado para el maíz, la glutamato hidrogenasa y la esterasa, como marcadores para distinguir callos embriogénicos y no embriogénicos (Everette *et al.*, 1985); esta última también sirve para diferenciar entre dos tipos de tejidos en Soya (Stejskal y Griga, 1985). En zanahoria, una peroxidasa de pl 7.6 parece ser un buen marcador de la embriogénesis somática, la cual actúa en la complementación, restableciendo la embriogénesis somática de un cultivo inhibido con Tunicamicina (Joersbo *et al.*, 1989; Cordewever *et al.*, 1991).

Un aumento de la actividad peroxidasa (Px), al igual que otras diferencias en los patrones isoenzimáticos de callos E y NE fueron detectadas por Kochba *et al.* (1987), citados por Lukse *et al.* (1997) en callos de naranja (*Citrus sinensis* L.).

La determinación de la actividad peroxidasa en diferentes subcultivos de callos de caña de azúcar en condiciones de laboratorio, permitieron comprobar que resulta mayor en los callos potencialmente embriogénicos (subcultivo 3) en comparación con los NE o poco embriogénicos (subcultivo 8) (Lukse *et al.*, 1997).

Las arabinogalactanoproteínas (AGPs)

Las arabinogalactanoproteínas (AGPs) pertenecen a la familia de los proteoglicanos, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Fincher *et al.*, 1983). Se encuentran fundamentalmente en la membrana plasmática, pared celular y espacios intercelulares de las células (Komalavilas *et al.*, 1991; Serpe y Nothnagel, 1995). Las AGPs son una mezcla de grupos de proteoglicanos que forman parte de macromoléculas ricas en hidroxiprolina. Estas son distinguidas por su alta relación de carbohidratos a proteína, predominando residuos de galactosa y arabinosa y en menor cantidad otros azúcares como ácido urónico. Típicamente la proteína está conformada por gran proporción de los aminoácidos

hidroxiprolina, serina, alanina, glicina y treonina (Du *et al.* 1996; Kreuger y van Holst, 1996). En estudios de clonación de algunas arabinogalactanoproteínas se ha dilucidado que la secuencia primaria varía, sin embargo se presentan dominios homólogos.

Las arabinogalactanoproteínas son proteínas tejido-específico en las plantas y en las suspensiones celulares son secretadas las AGPs en el medio de cultivo, variando en dependencia de la edad del cultivo y del potencial embriogénico (Kreuger y van Holst, 1995). Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen a AGPs se ha demostrado la regulación del desarrollo de algunos AGP-epitopos en órganos y embriones somáticos (Knox, 1997). Se ha encontrado que estas moléculas son importantes para la embriogénesis somática en zanahoria, por el hecho de que la adición de extractos de AGPs de semillas a suspensiones celulares subcultivadas durante dos años y suspensiones de líneas celulares no embriogénicas conllevó a la reinducción del potencial embriogénico (Kreuger y Van Holst, 1993). Estos autores caracterizaron los anticuerpos ZUM 18 y ZUM 15, empleando la base de la especificidad de los epitopos de dos AGPs, los cuales pueden mejorar (fracción de AGP ZUM 18) o inhibir (fracción de AGP ZUM 15) la embriogénesis somática (Kreuger y van Holst, 1995). Sin embargo, Toonen *et al.* (1997) demostraron que la fracción ZUM 18 añadida a líneas celulares embriogénicas no tiene ningún efecto en la frecuencia y morfología de los embriones somáticos.

Las AGPs reaccionan también con el reactivo de Yariv, molécula sintética que contiene fenil- β -glucósidos (Yariv *et al.*, 1962). Este reactivo ha sido muy utilizado en la detección, cuantificación y aislamiento de las arabinogalactanoproteínas en tejidos de plantas y cultivos celulares (Zhu *et al.* 1993). En el reactivo de Yariv es necesario que el enlace glicosídico esté en la conjugación β -anómica para que reaccione con las AGPs reconocido como el reactivo (β -D-Glc)₃ Yariv. Existen otros reactivos de Yariv, los cuales no reaccionan con AGPs como el reactivo (β -D-Man)₃ Yariv y el reactivo (-D-Gal)₃ Yariv. Estos reactivos pueden servir como controles para distinguir efectos relacionados con los AGPs de efectos no específicos al emplearse el reactivo (β -D-Glc)₃ Yariv en sistemas biológicos (Ding *et al.*, 1997).

Es conocido que las AGPs juegan un papel importante en el proceso de embriogénesis somática (Knox, 1997; Nothnagel, 1997). La mayoría de los estudios se han realizado en la especie *Daucus carota* L., con el empleo de microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos que reconocen AGPs, como es el epitopo JIM 4 el cual se encuentra en mayor proporción en la superficie de células periféricas de masas proembriogénicas de *Daucus carota* L. y en la dermis de proembriones (Knox, 1997). Además, durante el

desarrollo de embriones somáticos en etapa cotiledonal, estos epitopos pueden ser encontrados en el tejido provascular y en el hipocotilo (Stacey *et al.*, 1990). Por otro lado, el anticuerpo MAC 207 reconoce su epitopo dentro de todas las células de masas proembriogénicas. Otros epitopos de AGPs reconocidos por el anticuerpo JIM 8 fueron originalmente descritos como un marcador transicional de las células que rodean a las masas proembriogénicas de suspensiones celulares embriogénicas de zanahoria (Pennell *et al.*, 1992). Se demostró que los embriones somáticos desarrollan células sin el epitopo JIM18 (Toonen *et al.*, 1996) y la fracción de AGPs que contenía este epitopo tenía un efecto inhibitorio sobre la frecuencia de embriones desarrollados a partir de células simples (Toonen *et al.*, 1997). Como en zanahoria, la fracción ZUM18 mejoró el potencial embriogénico de suspensiones celulares de *Cyclamen* por incremento de la frecuencia de aparición de masas proembriogénicas (Kreuger *et al.*, 1995) y la fracción extracelular de AGPs estimuló el desarrollo completo de los embriones somáticos de abeto (*Picea abies*) (Egertsdotter y Arnold, 1995). Mc Cabe *et al.* (1997) refirieron que JIM 8 representa una señal soluble liberada por células no embriogénicas y es reconocida por las células embriogénicas y es regulada por la densidad celular en suspensiones celulares de zanahoria.

REFERENCIAS

- Albrechtová, JTP, Cvikrová M, Eder J (1994) Differentiation and polyamines level in primary leaf explants from alfalfa cultured on embryogenic and nonembryogenic media. Bio Planten 36 (Supp.) Abstract 9th of Brno. Praga. Czech Rep. 3-8 July
- Ammirato, PV (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. En: Green, CE, Somers DA, Hackett WP y Biesboer DD (eds) Plant Tissue and Cell culture Alan R. Liss. Inc. pp. 57-81 New York
- Ammirato, PV y Steward FC (1971) Some effects of the environment of the development of embryos from cultured free cell. Bot Gaz. 132: 149-158
- Ammirato, PV (1983) Embryogenesis. S. En: Evans D A, Sharp W R, Ammirato P V, Yamada Y (eds.). Handbook of plant cell culture. Vol. 1: Techniques for propagation and breeding. pp. 182-123. Macmilland Publishing Co. New York, Collier Macmilland Publishers London
- Archambault, J, Lavoie L, Williams RD, Chavarie C (1995) Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. En: Terzi, M (Ed.), Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, pp. 681-687 Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Ashihara, H, Fujimura T, Komamine A (1981) Pyrimidine nucleotide biosynthesis during somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol 104: 129-137
- Auboiron, E, Carron MP, Michaux-Ferrière N (1990) Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21: 31-37

- Beranger-Novat, N, Bonneau L, Martin-Tanguin J, Monin J (1990) Poliamine metabolism-evolution and effects of its specific inhibitors with dormancy breaking in zygotic embryos of a woody species *Euonymus europeaus* L cultured *in vitro*. En: Flores HE, Arteca RN, Shannon JC (eds.) Plant Physiology, biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. American Society of Plant Physiologists: pp. 363-364 Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Berros, B (1996) Ontogenia y caracterización molecular e histológica de la organogénesis-embriogénesis en avellano. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. España
- Biddington, NL (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. Plant Growth Reg. 11: 173-187
- Buddendorf-Joosten, JMC y Woltering EJ (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. S. 165-190 En: Lumsden PJ, Nicholas J, Daves WJ (eds) Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London
- Cazzulino, D, Pedersen H, Chin CK (1991) Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation. Cell Cult. Somatic Cell Genet. Plants 8: 147-177
- Cevallos, AM (2000) Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café (*Coffea* spp.), mediante el uso de marcadores morfofisiológicos y moleculares. Tesis de Doctorado. Univ. Agraria de La Habana
- Chen, SJ y Kao CH (1997) Ammonium inhibited growth of suspension-cultured rice cells as affected by medium pH. Plant Growth Regul. 21: 1-6
- Choi, JH, Liu L, Borkird C, Sung ZR (1987) Cloning of genes developmentally regulating during plant embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 1906-1910
- Cordewener, J, Booij H, Van der Zandt H, Van Engelen F, Van Kammer A, Vries S (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. Planta 184: 478-486
- Coutos-Thevenot, P, Maes O, Jouennen T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992) Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. Plant Sci. 86: 137-145
- Coutos-Thevenot, P, Maes O, Jouennen T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992) Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. Plant Sci. 86: 137-145
- de Fera, M (2000) Empleo de bioreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. 105 p.
- de Vries, SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde HD, Thomas TL, Van Kammen A (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. Planta 176: 196-204
- Denchev, PD, Kuklin AI, Scragg AH (1992) Somatic embryo production in bioreactors. J. Biotechnol. 48: 115-168
- Ding L, Zhu JK (1997) A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. Planta 203: 289-294
- Du, H, Clarke AE, Bacic A (1996) Arabinogalactan-protein: a class of extracellular proteoglycans involved in plant growth and development. Trends Cell Biol 6: 411-414
- Ducos JP, Zamarripa A, Eskes A, Pétiard V (1993) Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. En: 15ème Colloq. Sci. Int. Café. Montpellier, 6-11 June pp. 86-96. ASIC. Paris
- Dure, L (1985) Embryogenesis and gene expression during seed formation. Plant Mol. Cell Biol. 2: 179-197
- Egertsdotter, U, von Arnold S (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) Physiologia Plantarum 93: 334-345
- Esashi, Y, Ishizawa K (1989) Oxygen-independent ethylene action in cocklebur seed germination in relation to osmoregulation. En: Clijsters, (ed.). Biochemical and physiological aspects of ethylene production in flower and higher plants. Kluwer Academic Publisher Dordrecht
- Everette, NP, Wach MJ, Ashworth DJ (1985) Biochemical markers of embryogenesis in tissue culture of the maize inbred B 73. Plant Sci. 41: 133-140
- Gananapragasam S, Vasil IK. 1992. Cryoconservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. Plant Science 83: 205-215
- Gepts, P (1994) Análisis molecular del proceso de domesticación en plantas: el ejemplo del frijol (*Phaseolus vulgaris*). En: 11 Congreso Latinoamericano de Genética y XV Congreso de Fitogenética, Monterrey, Nueva León, México
- Gupta PK, Timmis R, Pullman G, Yabncney M, Kreitingner M, Carlson W, Carpenter C (1991) Development of the embryogenic system for automated propagation of forest trees. En: Vasil, I K (ed). Scale-up and automation in plant propagation. Cell culture and somatic cell genetic of plant. Vol. 8. pp. 75-93 Academic Press. Inc. San Diego
- Harrel RC, Bieniek M, Hood CF, Munilla R, Cantliffe DJ (1994) Automated, *in vitro* harvest of somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39: 171-183
- Hatzapoulos P, Fong F, Sung ZR (1990) Absciscic acid regulation of DC8, a carrot embryogenic gene. Plant Physiol 94: 690-695
- Hayashi M, Kosai T, Tateno M, Fujiwara K, Kitaya Y (1993) Effects of the lighting cycle on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* under Photomixotrophic culture conditions. Environ. Control Biol. 31(3): 169-175
- Heo J, Kozai T (1999) Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweetpotato plantlets. Environment Control in Biology 37 (1): 83-92
- Heo, J y Kozai, T (1999) Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweetpotato plantlets. Environment Control in Biology 37 (1): 83-92
- Hergarty PK, Smart NJ, Scragg AH, Fowler MW (1986) The aeration of *Cataranthus roseus* L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: The inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. J. Exp. Bot. 37: 1911-1920
- Hohe A (1999) Zur somatischen Embryogenese und Vermehrung von *Cyclamen persicum* Mill. In Bioreaktoren. Dissertation. Vom Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover zur Erlangung des akademischen Grades eines
- Hohe A, Winkelmann T, Schwenkel HG (1999) CO₂ accumulation in bioreactors suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Rep. 18: 863-867

- Hvoslef-Eide T (2000) Bioreactors for Propagation of Ornamental Plants. En: Strømme, E (ed) *Advances in Floriculture Research* pp. 132-142. Agricultural University of Norway
- Ibaraqui Y, Fukakusa M, Kurata K (1995) SOMES2: Imagen-analysis-based somatic embryo sorter. *Current Plant Science and Biotech. Letters*. 14: 701-706
- Jay V, Genestier S, Courduroux JC (1992) Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. En: Kozłowski, T T (Ed) *Flooding and plant growth* pp. 47-128, Academic Press, New York
- Jay V, Genestier S, Courduroux JC (1994) Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 205-209
- Jiménez E, de Fera M, Barbón R, Capote A, Chavéz M (1995) Empleo de biorreactores para la producción de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* cv. Catimor.). En: *Avances en biotecnología moderna, libro de reportes cortos*, vol.13. p. II.1–II.2
- Joersbo M, Andersen JM, Okkels FT, Rajagopal R (1989) Isoperoxidase as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiol Plant* 76: 10-16
- Johansson L y Erikson T (1984) Effects of carbon dioxide in anther cultures. *Physiol. Plant*. 60: 26-30
- Kawara R, Komamine A (1995) Molecular basis of somatic embryogenesis. En: YPS Bajaj. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol 30: 30-40 Springer-Verlag:
- Kessell RHJ, Carr AH (1972) The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *J. Exp. Botany* 23: 996-1007
- Kioyosue T, Satoh S, Kamada H, Harada H (1991) Purification and immunohistochemical detection as embryogenic cell protein in carrot. *Plant Physiol* 95: 1070-1074
- Kitaya Y, Shibuya T, Kozai T, Kubota C (1998) Effects of light intensity and air velocity on air temperature, water vapor pressure, and CO₂ concentration inside a plant canopy under an artificial lighting condition. *Life Support & Biosphere Science*. 5: 199-203
- Knox JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol* 171: 79-120
- Komalavilas P, Zhu JK, Nothnagel EA (1991) Arabinogalactan proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. *J. Biol Chem* 266: 15956-15965
- Komamine A (1998) Expresión génica en la embriogénesis somática. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO 98. La Habana (1-5 Junio): 516 p.
- Kozai T, Kitaya Y, Kubota C, Kobayashi R, Watanabe S (1996) Optimization of photoautotrophic micropropagation conditions for sweetpotato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) plantlets. *Acta Hort*. 440: 566-569
- Kozai T, y Jeong B (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 49-56
- Kreuger M, van Holst GJ (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189: 243-248
- Kreuger M, van Holst GJ (1995) Arabinogalactan proteins epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 197: 135-141
- Kreuger M, van Holst GJ (1996) Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol Biol* 30: 1077-1086
- Kvaalen H, von Arnold S (1991) Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell and Organ Culture* 27: 49-57
- León O (1998) Marcadores moleculares: principales tipos, bases moleculares, ventajas y limitaciones. En: *Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de plantas*. Cornide MT (Editora) CNIC.p: 1-18
- Litz RE, Schaffer B (1987) Polyamines in adventitious and somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). *J. Plant Physiol*. 128: 251-258
- Lukse E, Dinkova TD, Ramos Leal M (1997) Aspectos bioquímicos moleculares de la embriogénesis somática en plantas. *Ciencias biológicas* 27 (1-2-3): 13-17
- Luttman R, Florek P, Preil W (1994) Silicone-tubing aerated bioreactor for somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 157-170
- Ma JH, Yao JL, Cohen D, Morris B (1998) Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple cultures. *Plant Cell Reports* 17: 211-214
- McCabe P, Valentine T, Scott L, Pennell R (1997) Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *The Plant Cell* 9: 2225-2241
- Meijer EA, De Vries SC, Mordhorst AP (1999) Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high 2,4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Plant Cell Reports* 18: 656-663
- Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. En: Thorpe, T A (ed), *In Vitro embryogenesis in plants*: pp. 155 -230 Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Miyoshi K y Sato T (1997) Removal of the pericarp and testa of seeds of japonica and indica rice (*Oryza sativa*) at various oxygen concentrations has opposite effects on germination. *Physiologia Plantarum* 99: 1-6
- Montague MJ, Koppenbrink JW, Jaworsky EG (1999) Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota* L. Changes in intracellular contents and rates of synthesis. *Plant Physiol*. 62: 430-433
- Murphy R, Sites JW, Buth DG, Haulfear CH (1990) Proteins I: Isoenzymes electrophoresis. En: Hilles DM and Mortiz C. (eds) *Molecular systematics* pp. 56-87 Sinauer Associates, Sunderland
- Nguyen QT, Kosai T (1998) Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control. Biol.* 36(2): 59-75
- Nguyen QT y Kosai T (1998) Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control. Biol.* 36(2): 59-75
- Niu G, Kozai T, Kitaya Y (1996) Simulation of the time courses of CO₂ concentration in the culture vessel and net photosynthetic rate of Cymbidium plantlets. *Transactions of the ASAE*. 39 (4): 1567-1573
- Niu G y Kosai T (1997) Simulation of the growth of potato plantlets cultured photoautotrophically *in vitro*. *Transactions of the ASAE*. 40(1): 255-260
- Nothnagel EA (1997) Proteoglycans and related components in plant cell. *Int. Rev. Cytol*. 174: 195-291

- Noualle CH, Petiart, V (1988) Semecens artificielles: rêves et réalités. Biofutur 67: 33-38
- Okamoto A, Kishine S, Hirosawa T, Nakazono A (1996) Effect of oxygen enriched aeration on regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) cell culture. Plant Cell Report 15: 731-736
- Pennel RI, Jannice L, Scofield GN, Booij H, de Vries SC, Roberts K (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway of carrot somatic embryogenesis. The Journal of Cell Biology 119: 1371-1380
- Poulsen GB, Frugis G, Albrechten M, Marroti D (1996) Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non-embryogenic cell cultures of alfalfa. Plant Cell Tiss Org Cult 44: 257-260
- Preil W y Beck A (1991) Somatic embryogenesis in bioreactor culture. Acta Horticulturae 289: 179-192
- Preil W, Bertram A, Henning J, Schneidereit M (1996) Comparison of growth and nutrient uptake of embryogenic *Cyclamen persicum* cultivated in Erlenmeyer flask and bioreactor with rotating and vibrating stirrer. COST 822 Working Group 2, Abstracts of the Third Meeting of the working Group
- Preil W, Krause I, Schneidereit M (1998) Effects of CO₂ and O₂ on growth of embryogenic *Cyclamen persicum* bioreactor cultures. COST 822 Working Group 2, Abstracts of the Fifth Meeting of the working Group
- Preil W (1991) Application of bioreactor in plant propagation. En: Debergh, P C, Zimmerman, R H (eds.). Micropropagation, technology and application. pp.425-445 Klumer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London
- Preil W, Florek P, Wix U, Beck A (1988) Towards mass propagation by use of bioreactors. Acta Hort. 226: 99-106
- Reinert J (1958) Untersuchungen über die morphogenese and gewebwkulturen. Ver. Dtsc. Bot. Ges. 71: 15-51
- Rodríguez M, Lukse E, Maribona RH, Ramos Leal M (1996) Análisis inmunoquímico de la embriogénesis somática de la caña de azúcar. X Seminario Científico. INCA: 100
- Rodríguez M, Niubó E, Maribona RH (1999) Análisis inmunoquímico de la embriogénesis somática de suspensiones celulares de caña de azúcar. Revista CENIC. Ciencias biológicas 30(2): 25-32
- Roustan JP, Latché A, Fallot J (1989) Stimulation of *Daucus carota* L. somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene Synthesis: cobalt and nickel. Plant Cell Report 8: 182-185
- Roustan JP, Latché A, Fallot J (1990) Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. Biol. Plant 32: 273-275
- Saare-Surmisnski K, Preil W, Knox P, Lieberei R (2000) Arabinogalactan proteins in embryogenic and not-embryogenic callus cultures of *Euforbia pulcherrima*. Physiologia Plantarum 108: 180-187
- Sakano K, Kiyota S, Yazaki Y (1997) Acidification and alkalization of culture medium by *Catharanthus roseus* cells is anoxic production of lactate a cause of cytoplasmic acidification? Plant Cell Physiol. 38: 1053-1059
- Samaj J, Baluška F, Bobák M, Volkmann D (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. Plant cell Reports 18: 369-374
- Sánchez MD (1999) Curso de especialización en recursos fitogenéticos. Sección 2: caracterización de germoplasma vegetal. Departamento de biología Vegetal. E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, Madrid
- Serpe MD, Nothnagel EA (1995) Fractionation and the structural characterization of arabinogalactan proteins on the plasma membrane of rose cells. Plant Physiol 109: 1007-1016
- Shigeta J, Sato K, Mii M (1996) Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. Plant Science 115: 109-114
- Shimazu T, Kurata K (1999) Relationship between production of carrot somatic embryos and dissolved oxygen concentration in liquid culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 29-38
- Slay RM, Grimes HD, Hodges TK (1989) Plasma membrane proteins associated with undifferentiated and embryogenic *Daucus carota* tissue. Protoplasma. 139: 149-151
- Stacey NJ, Roberts K, Knox JP (1990) Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. Planta 180: 285-292
- Stejskal J, Griga M (1985) Comparative analysis of isoenzymes and proteins in somatic and zygotic embryos of soybean (*Glycine max* Merr.) J. Plant Physiol 146: 497-502
- Sterk P, Booij H, Gerard A, Schellekens A, van Kammen A, de Vries SC (1991) Cell specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. The plant Cell 3: 907-921
- Sung Z, Okimoto R (1981) Embryogenic proteins in somatic embryos of carrot. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (6): 3683-3687
- Sung ZR, Lazar GB, Dudits D (1981) Cyclohexamide resistance in carrot culture: a differentiated function. Plant Physiol 68: 261-264
- Szabados L, Mroginiski LA y WM Roca (1993) Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: Roca, W M y LA Mroginiski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. pp. 173-210 CIAP. CALI
- Thompson MR, Thorpe TA (1989) Biochemical aspects of crop improvement. (Khama Eds) CRC Press Boston
- Thorpe TA (1988) Organogenesis *in vitro*. Structural, physiological and biochemical aspects. En: IK Vasil (eds) International reviews of Cytology, Supplement 11A, perspectives in Plant cell and Tissue Culture pp. 71-112, Academic Press, New York
- Toonen M, Schmidt EDL, de Vries SC (1996) Cell tracking as a tool to study initial processes in somatic embryo development. Plant Tissue and Biotechnology 2: 3-10
- Toonen MAJ, Schmidt EDL, van Kammen A, de Vries SC (1997) Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. Planta 203: 188-195
- van Engelen FA, Sterk P, Booij H, Cordewener J, Kook W, van Kammen A, de Vries SC (1991) Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. Plant Physiol 96: 705-712
- van Engelen FA y SC de Vries (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. Trends Genet. 8: 66-90
- Veisseire P, Cailloux F, Coudret A (1994) Effect of conditioned media on the somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. Plant Physiol Biochem 32: 571-576
- Wurtele ES, Wang H, Durgerian S, Nikolau BJ, Ulrich TH (1993) Characterization of gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. Plant Physiol. 102: 303-312

- Yadav J S, Rajam MV (1998) Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular content in eggplant. *Plant Physiol* 116: 617-625
- Yariv J, Rapport MM, Graf L (1962) The interaction of glycosides and saccharides with antibody of the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem. J.* 85: 383-388
- Zhu, JK, Bressan RA, Hasegawa PM (1993) Loss of arabinogalactan-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells. *Planta* 18: 221-226
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423
- Ziv M (1995) The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*. 393: 25-38
- Zobayed SMA, Afreen- Zobayed, Kubota C, Kozai T (1999) Large-scale photoautotrophic micropropagation of *Eucaliptus* plantlets under forced ventilation. Abstr. The congress on *in vitro* Biology