

Transformación genética de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* (AAB) plátano hartón con *Agrobacterium tumefaciens*

Carlos Giménez*, Nohiris Sánchez y Maribel Colmenares

Departamento de Biología, Edificio A1, Facultad Experimental de Ciencias
Universidad del Zulia, Maracaibo 4002 - Venezuela

Recibido: 10-02-12 Aceptado: 27-07-12

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes factores sobre la transformación genética de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) de *Musa* (AAB) Giant False Horn (Hartón Gigante), mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 y el plásmido pCAMBIA 1304. A este respecto, se evaluó: 1. Dosis letal del antibiótico Higromicina como agente de selección, 2. Concentración de acetosiringona (AS), 3. Tiempo de co-cultivo y 4. Densidad del inóculo bacteriano sobre la transformación transitoria, estimando el porcentaje de agregados celulares con expresión del gen para la β -glucuronidasa (GUS). Como resultados se obtuvo que la dosis letal del antibiótico Higromicina para la selección de SCE en la fase de maduración y germinación de los embriones de *Musa* (AAB) Plátano Hartón Gigante, es de 15 mg/L. En la fase de infección se aplicó una fuerza centrifuga de 800 rcf para mejorar la interacción célula vegetal – bacteria. Las condiciones inductivas más eficientes fueron, 100 μ M de AS, densidad del inóculo bacteriano $DO_{600\text{nm}} = 1$ y un tiempo de co-cultivo de 72 h, con lo cual se obtuvo un 59% de agregados celulares con expresión de GUS. Adicionalmente se detectaron embriones somáticos totalmente transformados con una expresión GUS completamente uniforme.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, Suspensiones Celulares Embriogénicas, Plátano Hartón, β -glucuronidasa, transformación genética.

Musa (AAB) false horn plantain embryogenic cell suspension transformation with *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

The objective of this research was to evaluate the effects of different factors over the genetic transformation of embryogenic cell suspensions (ECS) of *Musa* (AAB) Giant False Horn with the strain EHA105 of *Agrobacterium tumefaciens* and the plasmid pCAMBIA1304. The parameters evaluated over the genetic transformation were the following: 1. the lethal dose of hygromycin, as selection agent, 2. acetosyringone concentration (AS), 3. time for bacterial and explants co-culture, and 4. optical density of the bacterial inoculum, calculating the percentage of cellular

** Autor para la correspondencia: carlosgimenez20@yahoo.es

clumps with β -glucuronidase (GUS) expression. The lethal dose of the antibiotic hygromycin, for the selection of ECS at maturation and germination phase, was 15mg/L. At the infection phase was applied a centrifugation treatment of 800 rcf to improve the plant cells and bacterial interactions. The best inductive condition was 100 μ M of AS, with O.D._{600nm}=1 with a co-culture time of 72 h, which showed a 59% of cellular clumps with GUS expression. Additionally, somatic embryos with uniform GUS expression were detected.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, embriogenic cell suspension, False Horn Plantain, β -glucuronidase, genetic transformation.

Introducción

La producción mundial del plátano (*Musa* AAB), en los últimos diez años, ha mostrado una tasa de crecimiento en continuo ascenso. En el año 2007, la producción se incrementó en 11,4%, llegando a 34.444.795 t, siendo los mayores productores, África, América Latina y el Caribe (LAC) y en último lugar Asia (1).

La producción de este rubro en Venezuela está representada principalmente por pequeños productores, cuyos métodos son tradicionales y poco tecnificados (2). Este cultivo es de suma importancia, ya que presenta una marcada dispersión geográfica, posicionándose como elemento básico en la seguridad alimentaria. En la actualidad, el Plátano Hartón Gigante representa casi la totalidad del plátano cultivado en el país (2).

El Plátano Hartón Gigante es un cultivar susceptible a *Mycosphaerella fijiensis* causante de la Sigatoka Negra. Esta enfermedad es devastadora para estos cultivos y su control con agroquímicos mal manejados es muy perjudicial para el ambiente. Además, este clon presenta problemas de caídas por vientos y número limitados de frutos independientemente del manejo agronómico. Todos estos problemas podrían ser resueltos mediante aplicaciones biotecnológicas orientadas al mejoramiento vegetal en diferentes áreas. A este respecto, los estudios genéticos a diferentes niveles, además de las interacciones planta-patógeno, control del tiempo de floración, nutrición mine-

ral, etc. son fundamentales para diseñar estos programas de mejoramiento genético. Entre las herramientas claves que debemos desarrollar están los protocolos para la micropropagación y transgénesis vegetal.

Este trabajo pretende fundamentar las bases para el establecimiento de un sistema de transformación genética en *Musa* (AAB) Plátano Hartón Gigante utilizando suspensiones celulares embriogénicas para futuros programas de mejoramiento genético.

Materiales y métodos

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas (SCE) de *Musa* (AAB) cv. Plátano Hartón Gigante, obtenidas a partir de yemas múltiples (3).

Determinación de la dosis letal del antibiótico higromicina

Para la determinación de la dosis letal, se plaquearon inóculos de 1 ml de SCE en cápsulas de Petri (80 x 15 mm) con papel de filtro Whatman estéril en medio RD1 sólido (3). Se utilizaron diferentes concentraciones del antibiótico Higromicina: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Se incubaron las placas en oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un mes, en medio RD1. Luego se cultivaron en medio RD2 y RD3 en luz fluorescente ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 30 días en cada medio, consecutivamente y manteniendo la selección correspondiente (3). En cada ciclo de cultivo (RD1, RD2 y RD3) se evaluó la dife-

renciación de embriones, callos y grado de oxidación de los mismos.

Cepa bacteriana y plásmido

Las suspensiones celulares embriogénicas (SCE) se transformaron usando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y como vector de transformación el plásmido pCAMBIA 1304 (4).

Para crecer la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, se inoculó en placas de Petri con medio YEP sólido (peptona 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 15 g/L, pH:7). La cepa de *A. tumefaciens* EHA105/ pCAMBIA 1304 se seleccionó con 100 mg/L de Kanamicina y 80 mg/L de Gentamicina. Luego se dejó crecer por un periodo de 48 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. A partir de este cultivo se inoculó una colonia bacteriana en un tubo tipo Falcon de 50 ml con 5 ml de medio YEP líquido con los antibióticos Kanamicina (100 mg/L) y Gentamicina (80 mg/L) para la selección del plásmido pCAMBIA 1304 a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación de 110 rpm por 2 días en oscuridad.

Posteriormente, los 5 ml de cultivo bacteriano se reinocularon en un Erlenmeyer de 150 ml con 50 ml de medio YEP líquido con los respectivos antibióticos. Los cultivos bacterianos se dejaron crecer a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación de 110 rpm por 24 h en oscuridad hasta alcanzar la densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 1 y diluida luego según los requerimientos del diseño experimental.

Transformación

Inducción bacteriana

Transcurrido el período de crecimiento de la bacteria, el cultivo se centrifugó a 3500 rcf por 15 min. Se descartó el sobrenadante y las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 50 ml de medio de inducción (5), con acetosiringona (AS), a diferentes concentraciones (10, 20, 40, 100, 200, 400 μM). Luego se incubó en agitación durante 3 h a $27 \pm 2^\circ\text{C}$

a 110 rpm, hasta obtener una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,6 ó 1 según el diseño experimental.

Pretratamiento con centrifugación y co-cultivo en medio sólido

Precultivo

A 100 μL de volumen celular sedimentado (VCS) de SCE se le aplicó un choque térmico a 45°C , durante 5 min. Luego se inoculó con 1 ml de bacteria previamente inducida y se centrifugó esta suspensión a 800 rcf durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, las muestras se incubaron sin agitación durante 25 min a 22°C (5).

Co-cultivo en medio sólido

Al transcurrir el periodo de pre-cultivo, las muestras de todos los tratamientos se pasaron por filtros de nylon (30 μm) para remover el exceso de bacteria. La suspensión celular quedó retenida en la malla de los filtros y estos se colocaron en medio ZZ sólido (3) por un periodo de co-cultivo de 24, 48 y 72 h según diseño experimental.

Una vez transcurrido el periodo de co-cultivo, cada uno de los discos que contenían las suspensiones celulares se lavaron en medio ZZ (3) líquido con 250 mg/L de Cefatoxima para eliminar la bacteria del medio. Posteriormente, las SCE se cultivaron en agitación en medio ZZ (3) líquido por al menos una semana en oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, para permitir que las células y agregados celulares se dividan y formen embriones. Luego se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas para la detección GUS según el diseño experimental.

Diseño experimental

Las SCE de *Musa* (AAB) cv. Plátano Hartón Gigante fueron infectadas con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, bajo diferentes condiciones. Los tratamientos correspondieron a la combinación de varios factores: concentración de AS, densidad óp-

tica del inóculo bacteriano y período de co-cultivo, con un arreglo factorial de 6x2x3 con tres réplicas como sigue: seis niveles de concentraciones de AS (10, 20, 40, 100, 200, 400 μ M), dos niveles de *Agrobacterium* a una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,6 y 1 y tres niveles de tiempo de co-cultivo 24, 48 y 72 horas. Para evaluar las posibles diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó una prueba de Duncan con un $P \leq 0,05$ mediante el software STATISTICA V 5.5 (6).

Evaluación de la transformación

Actividad GUS

El análisis colorimétrico histoquímico se realizó de acuerdo al método de Jefferson y col. (7). La muestra se fijó en una solución de formaldehído al 0,27%; 0,01 mM del amortiguador 2-[Morfolino] ácido etanosulfónico (MES) y 300 mM de manitol y luego se infiltró por vacío (400 mm Hg). Posteriormente, se sustituyó la solución de fijación por el reactivo X-Gluc 2 mM (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO), Buffer Fosfato 0,1 M pH 7, Ferrocianuro potásico 1 mM, Ferri-

cianuro potásico 1 mM y Tritón X-100 al 0,1%. Posteriormente se infiltró por vacío (400 mm de Hg) durante 15 min e incubó a 37°C durante 24 horas.

La presencia de agregados celulares embriogénicos o embriones con actividad transitoria GUS se evaluó al término del período de co-cultivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron en porcentajes de agregados celulares con actividad GUS, como criterio de la eficiencia de transformación.

Resultados y discusión

Determinación de la dosis letal del antibiótico higromicina

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* (AAB) cv. Plátano Hartón Gigante obtenidas a partir de yemas múltiples son sensibles a Higromicina a partir de una concentración de 15 mg/L (figura 1).

Durante el primer mes de selección en el medio de maduración de embriones (RD1) (3) se observó la formación de callos y embriones en los tratamientos sin selección

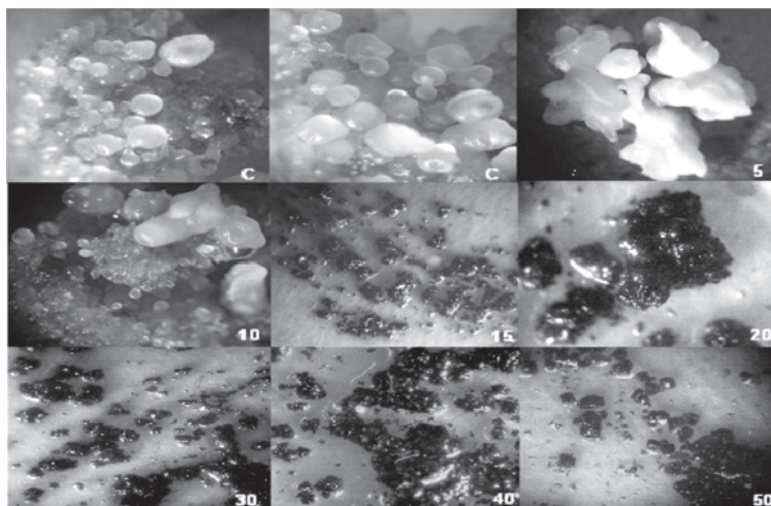


Figura 1. Tercer mes de cultivo en medio RD3 sólido. Se observa un desarrollo normal de los embriones con 0, 5 y 10 mg/L. A partir de los 15 mg/L de higromicina se inhibe totalmente el desarrollo de los embriones. C: controles (0 mg/L higromicina), 10, 15, 20, 30, 40, 50 mg/L de higromicina.

(controles) y con Higromicina (5 - 20 mg/L). En las concentraciones de 30, 40 y 50 mg/L de Higromicina, el grado de oxidación aumentó, sin embargo, aún persistían callos que no presentaban necrosis.

En el segundo mes de selección, en el medio de germinación (RD2), la presión de selección resultó más evidente en los tratamientos con 15, 20, 30, 40 y 50 mg/L de Higromicina. En los controles y en los tratamientos con bajas concentraciones de Higromicina (5 y 10 mg/L), se observó un aumento de estructuras embriogénicas de diferentes tamaños y estados de desarrollo. Por otro lado, a partir de 15 mg/L de Higromicina, sólo se observó un escape a la presión de selección en forma de un pequeño callo en una de las placas evaluadas, el resto estaba totalmente oxidado. Al tercer mes de cultivo, los embriones se transfirieron a un medio de enraizamiento (RD3), donde se continuó observando la diferenciación de más embriones y la germinación de los embriones al estado escutelar temprano en los tratamientos, control (0 mg/L) y con 5 ó 10 mg/L de Higromicina. En esta etapa, los embriones plaqueados en los tratamientos con 15, 20, 30, 40 y 50 mg/L se observaron totalmente necrosados producto de la acción tóxica del antibiótico (figura 1).

Algunos estudios han reportado la utilización de la Higromicina como agente de selección de tejidos transformados durante el proceso de transgénesis en Musáceas. En general, en los trabajos que reportan la selección de SCE obtenidas a partir de multiyemas, utilizan concentraciones más bajas de Higromicina. Pineda y col. (8), utilizaron 20 mg/L de Higromicina en medio líquido para la selección de SCE provenientes de multiyemas de *Musa* (AAB) Plátano Dominicano Hartón. Tripathi y col., (9), utilizaron 25 mg/L de Higromicina para seleccionar en medio de regeneración, meristemos apicales de *Musa* (AAB) cv. "Agbagba". Por otro lado, en la selección de SCE a partir de flores, se han re-

portado niveles más altos de Higromicina. Sági y col., (10) reportan 50 mg/L de Higromicina en la selección de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) del topocho *Musa* (ABB) cv. Bluggoe y del plátano *Musa* (AAB) Three Hand Planty, en medio ZZ. Ortiz y col. (11), utilizaron 75 mg/L en medio M3 (medio de regeneración) para la selección de SCE provenientes de flores masculinas y femeninas de los cultivares *Musa* (AAA) cv. Gran Enano y *Musa* (AAB) Curraré. Khanna y col., (5), reportan 50 mg/L de Higromicina desde M1 (medio de inducción de callos) hasta M3 para la selección de flores masculinas de *Musa* (AAA) cv. Gran Enano y *Musa* (AAB) cv. Lady Finger.

Los resultados en este trabajo, coinciden con el hecho de que SCE a partir de multiyemas son más sensibles a la Higromicina. Para las SCE obtenidas de multiyemas de Plátano Hartón Gigante fue de 15 mg/L, uno de los valores más bajos reportados en la literatura relacionada con Musáceas.

Efecto de la acetosiringona, tiempo de co-cultivo y densidad del inóculo bacteriano sobre la transformación genética

Mientras que Ramana y Narasimha (12), reportan que los compuestos fenólicos, como la acetosiringona, no son esenciales para la activación de los genes *vir* durante el co-cultivo para la transformación de genotipos recalcitrantes de *Oryza sativa* cultivar *Indica*, en *Musa* (AAB) Dominicano Hartón, Pineda y col., (8) recomiendan la utilización de AS durante todas las fases de inducción, infección y co-cultivo de este cultivar para su transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

Estos resultados muestran como plantas monocotiledoneas, tradicionalmente consideradas como recalcitrantes para la transformación con *Agrobacterium* sp. presentan diferencias de susceptibilidad a la infección propias de la especie.

Los resultados de la presente investigación evidencian que la utilización de ba-

jas concentraciones de AS (10, 20 y 40 μM) no permite inducir la transferencia del T-DNA, en consecuencia, no se obtuvieron resultados positivos de expresión GUS para las SCE de *Musa* (AAB) cv Plátano Hartón Gigante. Para lograr la transformación y la expresión GUS positivo (color azul), fue necesario utilizar 100 y 200 μM de AS (Figura 2). Sin embargo, solo el tratamiento con un inoculo bacteriano $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de 1 y 72 h de co-cultivo con 100 μM de AS, fue donde se logró un 59% de agregados celulares GUS positivo en muestras tomadas 72 horas luego del co-cultivo, mostrando diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba de Duncan $P \leq 0,05$. Mientras que con 200 μM de AS ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$ 0,6 y 48 ó 72 h de co-cultivo) bajó la eficiencia de transformación a 33,3% en muestras de SCE crecidas en ZZ (3) líquido durante 72 h (figura 2).

En todos los tratamientos ensayados con 400 μM de AS no hubo expresión GUS positivo en las SCE (figura 2). Posiblemente, estas concentraciones de AS sean tóxicas para la bacteria bajo estas condiciones de estudio o se produce un efecto inhibitorio en la interacción de estas con la célula vegetal

bajo las condiciones ensayadas. Pineda y col., (8) también reportan el mismo efecto negativo sobre la transgénesis al utilizar 400 μM de AS en la transformación de SCE de *Musa* (AAB) Plátano Dominic Hartón. Tripathi y col., (13) utilizan 100 μM de AS durante la preparación del inoculo bacteriano para la transformación de meristemos axilares de bananos africanos de altura. La concentración de 100 μM de AS, $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$ y 72 h de co-cultivo ha sido reportada por diversos autores como la más óptima para realizar el proceso de transgénesis en otras musáceas (5, 13-16).

Adicionalmente, bajo estas condiciones de infección (100 μM de AS, $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$ y 72 h de co-cultivo) se logró mantener la expresión transitoria del gen GUS, hasta un máximo 10 días luego del co-cultivo lográndose SCE con 93,2% de células GUS (+), cultivadas en medio ZZ (3) líquido. Luego comienzan a caer los porcentajes de células GUS (+) hasta un 52,3%, a los 18 días luego del co-cultivo. Ghosh y col., (17), realizan un análisis de expresión transitoria del gen GUS bajo diferentes promotores en suspensiones embriogénicas de *Musa* (AAA) Robusta, aplicando un

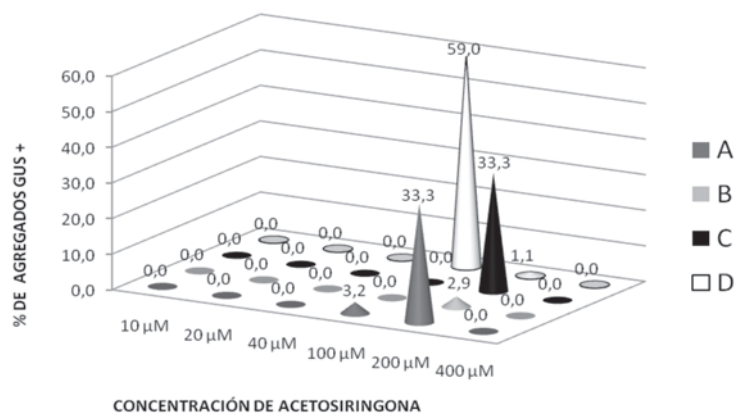


Figura 2. Porcentaje de agregados celulares (+) bajo diferentes tratamientos inductivos a los 3 días luego del co-cultivo. **A:** 0,6 ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$) 48 h de co-cultivo, **B:** 1 ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$), 48 h de co-cultivo, **C:** 0,6 ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$), 72 h de co-cultivo, **D:** 1 ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$), 72 h de co-cultivo. Todos los tratamientos fueron triplicados y sólo a 100 μM de AS, $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$ y 72 h de co-cultivo mostró una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Duncan, $P \leq 0,05$.

protocolo de infección con *Agrobacterium tumefaciens* usando 100 μM de AS, inóculo bacteriano de $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ 0,1 y 6 días de co-cultivo, obteniendo así una expresión transitoria GUS+ durante sólo 6 días después del co-cultivo. Es interesante hacer notar que el protocolo de infección reportado por Ghosh y col., (17) utiliza 10 veces menos inóculo bacteriano ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$ 0,1) que en este trabajo y el doble del tiempo de co-cultivo (6 días). Sin embargo, con nuestras condiciones de infección usando más inóculo ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$ 1) y menor tiempo de co-cultivo (3 días), se logran niveles de transformación más elevados (93,2%) y estables, inclusive luego de 18 días de cultivo en ZZ (3) líquido (52,3%).

Adicional a la estabilidad de la expresión transitoria del gen GUS, también se observó un patrón de expresión del gen desde agregados celulares hasta embriones completamente azules (figura 3). Esto probablemente responde a la combinación de eventos de transgénesis transitorios y permanentes en la suspensión, observándose un alto porcentaje de expresión luego de 18 días del cultivo de la suspensión en el medio ZZ (3) inductor de la embriogénesis.

Según Escalant y col., (18) y Cote y col., (19), la embriogénesis somática en Musáceas es de origen unicelular, logrando superar los problemas de quimerismo que se tenían con los protocolos de regeneración por inducción de yemas axilares. Esto explica la aparición de embriones con una expresión GUS totalmente uniforme en todo el cuerpo del embrión (figura 3) y la estabilidad de la expresión del gen durante más de 18 días.

En conclusión, la selección de suspensiones celulares de *Musa* (AAB) Plátano Hartón Gigante con el antibiótico Higromicina es posible en medio semisólido, a 15 mg/L durante las tres etapas de maduración, germinación y enraizamiento.

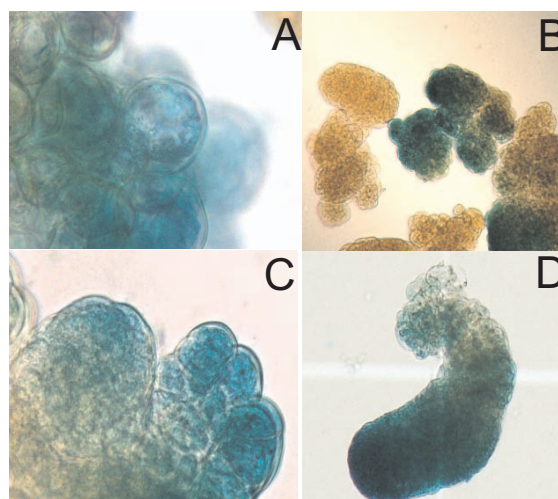


Figura 3. Agregados celulares y embriones GUS(+) (color azul) de suspensiones embriogénicas de *Musa* (AAB) Plátano Hartón Gigante. A: Células transgénicas GUS (+), B: Agregados transgénicos (azules) y no transgénicos, C: agregados compactos proembriogénicos GUS (+), D: Embrión transgénico GUS (+).

Las suspensiones celulares embriogénicas pueden ser transformadas mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105, usando 100 μM de AS, una $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de 1 y 72 h de co-cultivo. También se encontró que concentraciones de 400 μM de AS pueden ser inhibitorias de la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Estas condiciones de infección permitieron lograr expresión transitoria del gen GUS luego de más de 18 días después del co-cultivo, lo que hace ideal a este sistema como modelo para estudios de nuevos promotores genéticos, además de sus aplicaciones para la transformación genética estable en Musáceas.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CONDES 255-10 y 256-10, de la Universidad del Zulia.

Referencias bibliográficas

1. http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE_BY_DOMAIN. Fecha de la consulta 16/05/2012
2. MARTÍNEZ G. *Producción Agropecuaria* 2(1): 31-44. 2009.
3. STROSSE H., SCHOofs H., PANIS B., ANDRE E., REYNIERS K., SWENNEN R. *Plant Sci* 170(1): 104-112. 2006.
4. HOOD E., GELVIN S., MELCHERS L., HOEKAMA A. *Transgenic Res* 2(4): 208-218. 1993.
5. KHANNA H., BECKER D., KLEIDON J., DALE, J. *Mol Breed* 14(3): 239-252. 2004.
6. STATSOFT, Inc. 1999. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. <http://www.statsoft.com>.
7. JEFFERSON R., KAVANAGH T., BEVAN M. *EMBO J* 6(13): 3901-3907. 1987.
8. PINEDA C., TORO N., NARVÁEZ J., OROZCO M., LAIGNELET A., CÁRDENAS H. *Infomusa* 11(2): 9-13. 2002.
9. TRIPATHI L., TRIPATHI J., HUGHES J. *Afr J Biotechnol* 4(12) : 1378- 1383. 2005.
10. SÁGI L., PANIS B., SCHOofs H., DE SMET K., SWENNEN R., CAMMUE B. *Nat Biotechnol* 13 (5): 481- 485. 1995.
11. ORTÍZ J., GÓMEZ M., VÁSQUEZ N., AGUILAR M. ACORBAT. Memorias XV Reunión realizada en Cartagena de Indias, Colombia. 49-53. 2002.
12. RAMANA M., NARASIMHA G. *Plant Biotechnol* 24(5): 507- 511. 2007.
13. TRIPATHI L., TRIPATHI J., TUSHEMEREIRWE W. *Afr J Biotechnol* 7(10): 1438-1445. 2008.
14. ACERETO E., CHI-MANZANERO B., ECHEVERRÍA-ECHEVERRÍA S., GRIJALVA R., JAMES K., GONZÁLEZ-ESTRADAT., CASTAÑO E., RODRÍGUEZ-ZAPATA L. *Sci Horti-Amsterdam* 105(3): 359-371. 2005.
15. GANAPATHI T., HIGGS N., BALINT-KURTI P., VAN ECK J. *Plant Cell Rep* 20(2) : 157-162. 2001.
16. MAY G., AFZA R., MASON H., WIECKO A., NOVAK F., ARNTZEN C. *Nat Biotechnol* 13 (5): 486-492. 1995.
17. GHOSH A., SHEKHAWAT U., GANAPATHI T., BAPAT V. *J Plant Biochem And Biotechnol* 2011. Publicado en línea: <http://www.springerlink.com/content/6207m226j40p8756/>.
18. ESCALANT J., TEISSON C., COTE F. *In Vitro Cell Dev Biol* 30(4):181-186. 1994.
19. CÔTE F., DOMERGUE R., MONMARSON S., SCHWENDIMAN J., TEISSON C., ESCALANT J. *Physiol Plantarum* 97(2): 285-290. 1996.