

RESEÑA REFERATIVA

ASPECTOS BIOQUIMICO-MOLECULARES DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA EN PLANTAS

E. Lukse, T.D. Dinkova y M. Ramos Leal.

Dpto. Bioplantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de junio de 1996.

RESUMEN La embriogénesis somática como proceso que permite la regeneración de plantas *in vitro*, brinda oportunidades para las manipulaciones y el mejoramiento genéticos. En este trabajo se reseñan las principales tendencias actuales en las investigaciones bioquímico moleculares de este proceso.

ABSTRACT. Somatic embryogenesis as a process which regenerates *in vitro* plants, provides challenging opportunities for the genetic manipulations and improvement. This paper revises the main current tendencies in the biochemical and molecular investigations of this process.

INTRODUCCION

Uno de los procedimientos para la obtención de plantas *in vitro* es la embriogénesis somática. Este proceso incluye dos etapas: la inducción de las células con competencia embriogénica y el desarrollo de las masas embriogénicas en embriones. Sin embargo, no todas las células presentes en el cultivo de callos, experimentan el desarrollo embriogénico. Esto depende de las condiciones de cultivo, de las líneas celulares empleadas y de otras variantes.^{1,2} También existen considerables evidencias de que la respuesta *in vitro* de la planta está influenciada fundamentalmente por factores genéticos.^{3,4}

La caracterización de las poblaciones embriogénicas (E) y no embriogénicas (NE) 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 E homogéneo que permita futuras manipulaciones en las suspensiones celulares.^{5,6}

Una visión de la embriogénesis somática

El primer reporte publicado sobre la embriogénesis somática *in vitro* fue en 1958 en zanahoria (*Daucus carota* L.). Sin embargo, ya en 1978 este fenómeno se conocía para 88 especies en 33 familias de plantas. Actualmente, este número se ha incrementado a 130 especies, incluyendo angiospermas y gimnospermas.

La embriogénesis somática es un proceso de desarrollo. Se han observado cuatro fases (0-3) en la evolución de la embriogénesis somática en cultivos como la zanahoria.⁷ En la fase 0 las células simples experimentan una lenta división en presencia de auxinas. En la formación de grupos celulares embriogénicos, se observa la síntesis de ARN y ADN, la localización de Ca y ARNm. La transferencia a un medio libre de auxina provoca la división celular a elevada velocidad, con una síntesis activa de ARN y proteínas (fase 1). La formación de embriones globulares en la fase 2 está caracterizada por la síntesis activa de ADN. Los embriones con forma de corazón aparecen durante la fase 3. La embriogénesis somática tiene ventajas sobre los métodos organogénicos de múltiples etapas de formación *in vitro*, al presentar mayor eficiencia del

proceso con reducción de trabajo, tiempo y costo teniendo las plántulas una morfología y citología uniforme.^{8,9}

Papel de las auxinas en la iniciación de la embriogénesis somática

Dado que la embriogénesis somática es un proceso eminentemente regulatorio, es de vital importancia la concentración de auxinas para el crecimiento de callos y formación de embriones. Algunas células en presencia de auxinas adquieren totipotencia, forman grupos celulares proembriogénicos y pasan a la etapa globular. LoSchiavo y col.¹⁰ comprobaron que en cultivo de zanahoria, las células vegetativas pueden modular las proteínas que se unen a auxinas en respuesta a la presencia del regulador, mientras que las embrionales no pueden hacerlo.

Estudios realizados en alfalfa (*Medicago sativa* L.) demuestran que las células E son más sensibles a los tratamientos con 2,4-D que las células NE.¹¹ Por otra parte, en zanahoria se ha encontrado que la mayoría de los grupos de células E forman embriones somáticos en ausencia de 2,4-D y no en su presencia.¹²

El 2,4-D es el regulador más importante de la embriogénesis somática, aunque se ha estudiado también la eficiencia del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético sobre el 2,4-D para inducir la embriogénesis en uvas (*Vitis spp*).¹³ Otros analogos del 2,4-D son más eficientes para inducir el crecimiento de callos en maíz (*Zea mays* L.), los cuales al ser aplicados en el medio de cultivo, experimentaron una mayor actividad auxínica que el 2,4-D.¹⁴

Aspectos estructurales de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática puede ocurrir de forma indirecta pasando por la etapa de calogénesis o de forma directa,⁸ dependiendo su inducción de varios factores tales como los reguladores del crecimiento utilizados y el genotipo del explante.¹⁵ El desarrollo de embriones somáticos a partir de células, exhibe diferentes etapas morfológicas (globular, de corazón y torpedo),¹⁶ alcanzando finalmente una organización bipolar.¹⁷ Sin embargo, no todas las células experimentan embriogénesis; las NE se dividen sin formar estructuras

organizadas ni homogéneas. En la mayoría de los cultivos celulares, las pequeñas células E coexisten con las grandes NE, durante muchos subcultivos.

Una de las etapas más difíciles y cruciales en el proceso embriogénico es la sincronización de poblaciones E homogéneas, la cual resulta necesaria al comienzo del proceso.^{18,19} La necesidad de mejorar dicha selección ha requerido iniciar el estudio del proceso embriogénico a diferentes niveles, además del morfológico, entre los que se incluyen el bioquímico y el molecular.

Estudios bioquímicos generales sobre la embriogénesis somática

Uno de los principales enfoques experimentales abordados ha sido el establecer puntos de comparación entre las diferentes poblaciones celulares. Se han hallado algunas diferencias al comparar células E y NE. En las etapas globular y de 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.⁷

En caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido) se ha estudiado el metabolismo de los azúcares endógenos, observándose que la ribosa, manosa y glucosa son más abundantes en la fracción de células E, lo que indica el metabolismo activo de estas células. Por otra parte, las células NE contienen más fucosa, siendo equivalente el ácido urónico en los dos tipos de células.²¹

Otro cambio bioquímico asociado al proceso de embriogénesis es la proporción de síntesis de ARN y proteínas, siendo estas mayores en el cultivo E. La síntesis de dos proteínas específicas de embriones somáticos, la capacidad para inactivar la cicloheximida y α -amanitina y un aumento en la actividad de la arginina-descarboxilasa han revelado la ocurrencia de cambios en la expresión de genes durante la embriogénesis somática.¹⁶ El metabolismo de las poliaminas está también involucrado en el desarrollo del embrión. Al usar inhibidores específicos de la biosíntesis de poliaminas se demostró que el metabolismo por la vía de la arginina descarboxilasa es la ruta esencial en las fases tempranas de la embriogénesis. Esta se ha visto involucrada en la proliferación de células E y regeneración en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). Esta vía es importante en el mantenimiento del potencial embriogénico del cultivo *in vitro*, mientras que la vía ornitina-descarboxilasa está involucrada en la división celular en ausencia de reguladores de crecimiento.²²

Las proteínas como marcadores de la embriogénesis somática

Los embriones y células no diferenciadas son claramente distinguibles unas de otras por sus patrones proteicos.²³ En varias especies de plantas se han detectado proteínas como posibles marcadores de la embriogénesis somática.^{17,23,24} Sin embargo, solamente en unos pocos casos se ha demostrado su verdadera relación con este proceso.^{25,26}

• Análisis de isoenzimas en células E y NE

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 y col.²⁷ en líneas de callos de naranja (*Citrus sinensis* L.).

Las isoenzimas glutamato-deshidrogenasa (GDH), peroxidasa (Px) y fosfatasa en callos E y NE, han sido analizadas para su utilidad como marcadores bioquímicos del proceso embriogénico en maíz.²⁸ Los resultados de este trabajo sugieren que las más adecuadas como marcadores de la embriogénesis son las GDH, ya que para ellas, se observaron las mayores diferencias entre los callos E y NE en los zimogramas estudiados. También se han encontrado Px catiónicas secretadas al medio con un importante papel en la embriogénesis somática.

Estudios sobre la actividad Px en diferentes subcultivos de callos de caña de azúcar en condiciones de laboratorio, permitieron comprobar que resulta mayor en los callos potencialmente E (subcultivo 3) en comparación con los NE o poco embriogénicos (subcultivo 8).²⁹

Mediante estudios de laboratorio realizados por los anteriores autores, ha podido comprobarse el efecto del 2,4-D en los patrones de isoenzimas, observándose un aumento de la estequiometría relativa de las bandas en los sistemas esterasa y Px con el incremento de la concentración del 2,4-D en el medio de cultivo de los callos (inédito).

• Análisis de epirroteínase en células E y NE

Se han encontrado diferencias en el contenido proteico de callos E y NE para diferentes cultivos.^{21,23,24,30}

En arroz, la electroforesis de proteínas totales ha mostrado diferencias cuantitativas entre los callos E y NE y el extracto de embriones. Dos polipéptidos de 24 y 54 kDa, se encontraron presentes en células E y embriones, lo cual sugirió la presencia de proteínas específicas de la embriogénesis, mientras otro polipéptido de 22,7 kDa, se encontró en los callos NE.³⁰

Estudios en caña de azúcar confirmaron la presencia de proteínas de alto peso molecular (65 a 70 kDa) específicas de células E. Estas proteínas aparecen glicosiladas y son específicas de la fracción pesada donde hay núcleo, siendo superior también el contenido de arginina endógena y ácido glutámico.²¹ Análisis recientes de proteínas totales de callos E y NE de caña de azúcar detectaron dos proteínas presentes en los extractos E y NE. El peso molecular de 79 y 50 kDa respectivamente, fue similar al encontrado en los reportes previos de Guiderdoni y col.²¹ y Chen y Luthe.³⁰ Esto indica su posible relación con alguna función específica durante el proceso de embriogénesis.

Estudios de electroforesis bidimensional de proteínas en *Cichorium* mostraron varios polipéptidos agrupados diferencialmente en tres grupos en las células E: uno asociado con el producto de los genes que están involucrados en las vías metabólicas básicas de la célula (genes *housekeeping*); otro que representa el producto de los genes correspondientes a la fisiología de la hoja y el tercero que aparece durante la inducción de la embriogénesis en líneas E y en los embriones. Vale destacar que estas proteínas no son detectables en líneas que no regeneran.²⁴

• Papel de las proteínas extracelulares en la embriogénesis somática

Las proteínas relacionadas con la etapa preglobular del desarrollo de los embriones somáticos son las llamadas proteínas tempranas (EP),³¹ tratándose fundamentalmente de proteínas extracelulares. Existen evidencias de que ellas promueven la embriogénesis y algunas parecen ser producidas por células específicas.²⁵

El papel de una de estas proteínas (EP-2) es el transporte de ácidos grasos a las células epidérmicas. Su presencia marca la adquisición de potencial embriogénico en el cul-

tivo de suspensiones de zanahoria. La expresión de EP-2 ocurre en los embriones somáticos y suspensiones E, pero no en cultivos NE.^{25,31} Han sido descritas otras glicoproteínas producidas solamente por células NE que no favorecen el proceso de embriogénesis somática.²⁵ Al estudiar esas proteínas extracelulares en cultivos de uva se ha encontrado equivalencia con las de zanahoria basado en su peso molecular.²⁶ También en ambos cultivos se acumula peroxidasa catiónica de peso molecular 36 kDa.

A nivel de laboratorio, mediante técnicas inmunoquímicas se ha detectado la presencia de la proteína EP-2 en suspensiones de células E de caña de azúcar (artículo en preparación). Esto parece evidenciar la conservación de estos genes a partir de especies tan diversas.

En cultivo de zanahoria ha sido detectado un polipéptido de peso molecular 65 kDa (GP65) en el medio de cultivo sin 2,4-D de células E y NE. Se comprobó además, que la formación de embriones está relacionada con la abundancia de GP65 y GP57.¹²

Manifestaciones moleculares durante el proceso embriogénico

La mayoría de la información relacionada con los aspectos moleculares de la embriogénesis somática ha sido obtenida a partir de los trabajos en zanahoria y alfalfa como sistemas modelos,^{11,32} aunque en trigo (*Triticum aestivum* L.) se reportan también varios trabajos.³³⁻³⁵

• Organización del genoma mitocondrial (mt)

En el cultivo de tejidos de trigo, se ha encontrado que en los primeros momentos del proceso de calogénesis ocurren

cambios en la organización del genoma mt. Estos cambios son diferentes para los callos E y NE y se estabilizan rápidamente,³³ dependiendo además del potencial embriogénico del cultivo parental utilizado. Mediante el empleo de la enzima de restricción Sal I se localizó una región altamente variable en el ADN mt, la cual se estudió en relación con el proceso de embriogénesis somática. Empleando variedades de trigo altamente E y poco E se determinó que los cambios detectados en esta región están relacionados con la capacidad de regeneración de las células.³⁴

Recientemente, se comprobó que el efecto del cultivo de tejidos *in vitro* sobre la organización del genoma mt depende del tejido somático o de las células gaméticas empleadas, así como del tiempo que el tejido se mantiene en el cultivo.³⁵ Al analizar las plantas regeneradas, se observó que muchos de los reordenamientos observados en el ADN mt fueron característicos del cultivo de tejidos, siendo transitivos durante la primera generación de plantas (F1).

• Regulación de la expresión de genes. Importancia de la metilación

Luego de iniciada la embriogénesis somática por factores externos como la presencia de 2,4-D, ocurre la reprogramación de la expresión génica, la cual es responsable de la ocurrencia normal de esta vía de desarrollo en las plantas. Dure³⁶ clasificó los genes involucrados en la embriogénesis en cinco clases, las cuales marcan las diferentes etapas del proceso (Tabla I).

La caracterización de estos genes marcadores es necesaria para la realización de un análisis molecular adecuado de la embriogénesis somática.

TABLA I
Regulación de la expresión de genes durante el proceso de embriogénesis

Clase de genes	Función
I	Se expresan durante todo el desarrollo (Constitutivos).
II	Se expresan sólo en embriones (Embrio-específicos).
III	Se expresan durante la embriogénesis temprana.
IV	Codifican para proteínas de semilla antes de madurar.
V	Se expresan durante embriogénesis tardía antes de germinar la semilla.

Dure.³⁶

Estudios en alfalfa han permitido diferenciar los patrones de expresión de dos genes 2,4-D dependientes en callos E y NE del cultivo, demostrándose que de esta forma, se regula la potencialidad E de las células.¹¹ Por otra parte, junto con los genes auxina-dependientes se han realizado estudios que permitieron identificar genes específicos para los embriones de zanahoria que marcan el desarrollo de cada estadio de la embriogénesis mediante la síntesis de proteínas específicas de cada etapa.³⁷⁻³⁹

La mayoría de estos marcadores, se ha encontrado durante el estudio de la embriogénesis somática de zanahoria como sistema modelo, sin embargo, su utilidad se extiende a otras especies dado que en la mayoría de los casos, las secuencias son conservadas.^{31,40}

Desde hace muchos años, se ha reconocido el papel que juega la metilación del ADN en el control y la regulación de la actividad de los genes.⁴¹⁻⁴⁴ Hoy existe la certeza de que ocupa un lugar clave en el control de los mecanismos que gobiernan la función de los genes y la diferenciación de los organismos.

La metilación del ADN se ha visto relacionada con los procesos de desarrollo celular, la embriogénesis zigótica y

somática. En zanahoria se ha observado que la presencia de 2,4-D y otras hormonas en el medio de cultivo, produce alteración en los patrones de metilación.^{32,45,46}

En estudios sobre los niveles de metilación en callos de caña de azúcar, se ha encontrado que existe una estrecha relación entre la concentración de 2,4-D en el cultivo, la metilación del ADN y la capacidad para la regeneración de plantas (enviada a publicar). Se ha analizado la presencia de 5-metilcitosina en genes específicos que regulan el proceso embriogénico en cultivos con diferente grado de embriogénicidad y capacidad regenerativa.

Dada la importancia del papel que juega la metilación en la regulación de los procesos de embriogénesis y diferenciación, se han ampliado los estudios a otros procesos similares como la embriogénesis sexual y la organogénesis. En sentido general, se puede decir que la regeneración puede ocurrir por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática. Ambas son capaces de regenerar plantas, a pesar de poseer un programa de regulación diferente. Teniendo en cuenta esto, pueden establecerse cambios moleculares asociados a ambos eventos (Tabla II).

TABLA II
Aspectos comparativos entre la organogénesis y la embriogénesis somática en las plantas

Organogénesis	Embriogénesis somática
Iniciación de un primordio unipolar que se desarrolla en vástago.	Producción de estructuras bipolares con los dos extremos: raíz/vástago.
Incremento de ácidos nucleicos en regiones organogénicas.	Síntesis de RNA, DNA y proteínas en las cuatro fases de desarrollo.
Incremento de enzimas específicas como la ATPasa en tejidos formadores de brotes.	Existencia de altos niveles de arginina-d Descarboxilasa en tejidos formadores de brotes.
Producción de NADPH y ATP, siendo un evento altamente energético.	Vinculación del metabolismo de las poliaminas al desarrollo de los embriones.
Acumulación de carbohidratos de acuerdo con los requerimientos químicos.	Aumento de la síntesis de lípidos en determinadas etapas. Acumulación de triacilglicéridos y almidón.

Aplicaciones futuras de la embriogénesis somática

El establecimiento de suspensiones de células E sincronizadas en un amplio intervalo de genotipos, es necesario para la propagación clonal y proporciona el material adecuado para dilucidar procesos bioquímicos y moleculares involucrados en la embriogénesis somática.²¹

El desarrollo del cultivo de tejidos altamente embriogénico en gramíneas ha conducido a una regeneración eficiente de plantas agronómicamente importantes, pertenecientes a esta familia.^{9,47} Sin embargo, los problemas relacionados con el desarrollo, la fisiología, la genética y la biología molecular de estas plantas, aún son difíciles de interpretar. El análisis de la embriogénesis somática a nivel molecular constituye un paso importante en el sentido de la transformación genética y la regeneración de plantas, ya que al obtener suspensiones celulares E homogéneas se facilita la obtención de un número mayor de transformantes regenerados en plantas.

La idea primitiva de Murashige de encapsular los embriones somáticos para dar lugar a semillas artificiales, es hoy una realidad cercana para diversos cultivos de gran interés.⁴⁸ Sin embargo, la embriogénesis somática, como capacidad de inducir la transformación de una célula asexual y poco diferenciada en un grupo de células, constituye hoy día el factor limitante más importante cuando se desea ampliar el número de especies para obtener semilla artificial.⁴⁹

Una última cuestión que puede desencadenar un debate de grandes magnitudes en el futuro, es el uso de la apomixis.⁵¹ Se trata de un fenómeno por el cual ciertas plantas producen semilla asexual, y está alcanzando gran relieve en algunos círculos científicos, aunque en algunos casos, se trata con escepticismo en relación con sus potencialidades.⁵⁰ ¿Es la embriogénesis somática un caso parecido al fenómeno de apomixis expresado *in vitro*? ¿Existe relación entre la embriogénesis somática y la apomixis? ¿Resulta lógico pensar en la existencia de genes universales para el proceso embriogénico por vía sexual, asexual y somática? Estas son cuestiones cuya respuesta, sin duda, ayudará a dilucidar algunas de las principales incógnitas que existen alrededor de estos temas.

BIBLIOGRAFIA

1. Lorz H. In: Genetic Manipulation: Impact on man and society. W. Arber, K. Illmensee, W.J. Peacock and P. Starlinger (Ed.). The ICSU Press, Cambridge, 103-114, 1984.

2. Jansen M.A.K., Booij H., Shel J.H.N. and De Vries S.C. **Plant Cell Report**, **9**, 221, 1990.

3. Muller E., Brown P.T.H., Harke S. and Lorz H. **Theor. Appl. Genet.**, **80**, 673, 1990.

4. Brown P.T.H., Yoneyama K. and Lorz H. **Theor. Appl. Genet.**, **78**, 321, 1989.

5. Nouaille C.H. y Periat V. **Biofutur**, abril, 1988.

6. Gnanapragasam S. and Vasil I.K. **Plant Science**, **83**, 205, 1992.

7. Thompson M.R. and Thorpe T.A. In: Biochemical aspects of crop improvement. K.R. Khanna (Ed.), CRC Press. Boston, 328, 1989.

8. Thorpe T.A. ISI Atlas of Science: **Animal and Plant Science**, **1**, 81, 1988.

9. Vasil V., Redway F. and Vasil I.K. **Bio/Technology**, **8**, 429, 1990.

10. LoSchiavo F., Filippini F., Gozzani F., Vallone D. and Terzi M. **Plant Physiol.**, **97**, 60, 1991.

11. Bogre L., Stefanou M., Abraham M., Somogyi I. and Dudits D. In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas and J. van Aartijk (Ed.), 427, 1990.

12. Satoh S., Kamada H., Harada H. and Fujii T. **Plant Physiol.**, **881**, 931, 1986.

13. Matsuta N. **Japan J. Breed**, **42**, 879, 1992.

14. Sánchez de Jiménez M., Albore M. and Loyola-Vargas V.M. **Ann. Appl. Biol.**, **98**, 347, 1981.

15. Dudits D., Bogres L. and Gyorgyey J. **J. of Cell Science**, **99**, 475, 1991.

16. Sung Z.R., Fienberg A., Chorneav R., Borking CH., Furner I., Smith J., Terzi M., LoChiavo F., Giuliano G., Pitto L. and Nutironchi V. **Plant Mol. Biol. Rep.**, **2**, 3, 1984.

17. Novak F.J., Afza R., Van Duren M., Perea-Dallos M., Conger B.V. and Xiaolong T. **Bio/Technology**, **7**, 154, 1989.

18. LoChiavo F. **Plant Mol. Biol. Rep.**, **2**, 15, 1984.

19. Diaz E., Korneva S.B., Maribona, R.H. and Ancheta O. **Biología Aplicada**, **8**, 53, 1991.

20. Wurtele E.S., Keller G.L., Nikolau B.J. and Ulrich T.H. **J. Plant. Physiol.**, **132**, 683, 1988.

21. Guiderdoni E., Merot B., Eksomtramage T., Paulet F., Feldman P. and Glaszmann J.C. **Biotechnology in Agricultural. and Forestry**, 1992.

22. Koetje D.S., Kononowicz H. and Hodges T. **Plant Physiol**, **141**, 215, 1993.

23. Hahne G., Mayer J.E. and Lorz H. **Plant Science**, **55**, 267, 1984.

24. Hilbert J., Duhois T. and Vasseur J. **Plant Physiol. Biochem**, **30**, 733, 1992.

25. Van Engelen F.A. and De Vries S.C. **Trends in Genetics**, **8**, 66, 1992.

26. Thevenot P., Maes O., Jovenne T., Mauro M.C. Boulay M., Deloire A. and Guern J. **Plant Science**, **86**, 137, 1992.

27. Kochba J., Lavee S. and Roy S.P. **Plant Cell Physiol.**, **18**, 463, 1987.

28. Franz P.F., de Ruyter N.C.A. and Shell J.H.N. **Plant Cell Reports**, **13**, 67, 1989.

29. Díaz P., Ruiz A. y Ancheta O. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **17**, 59, 1986.

30. Chen L.J. and Luthe D.S. **Plant Science**, **48**, 181, 1987.
31. Sterk P., Booij H., Schellenkens G.A., Van Kammen A. and De Vries S.C. **Plant Cell**, **3**, 907, 1991.
32. LoSchiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S. and Terzi M. **Theor. Appl. Genet.**, **77**, 325, 1989.
33. Rode A., Hartmann C., Falcone D., Lejeune B., Quetier F., Benslimane A., Henry Y. and De Buyser J. **Current Genet**, **12**, 369, 1987.
34. Rode A., Hartmann C., De Buyser J. and Henry Y. **Current Genet.**, **14**, 387, 1988.
35. Moreire-Le Paven M.C., De Buyser J., Henry Y., Corre I., Hartmann C. and Rode A. **Theor. Appl. Genet.**, **85**, 9, 1992.
36. Dure L. **Oxford Survey Plant Molecular Cell Biology**, **2**, 179, 1985.
37. Reinbothe C., Tewes A. and Reinbothe. **Plant Sc.**, **82**, 47, 1992.
38. Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Higashi K., Satoh S., Kamada H. and Harada H. **Plant Mol. Biol.**, **19**, 29, 1992.
39. Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kamada H. and Harada H. **Plant Mol Biol.**, **21**, 1053, 1993.
40. Williams B.A. and Tsang A. **Plant Physiol.**, **100**, 1067, 1992.
41. Razin A. and Riggs A. **Science**, **210**, 604, 1980.
42. Bird A. **Cell**, **70**, 5, 1992.
43. Weising K. and Kahl G. **Naturforsch** **46c**, 1, 1991.
44. Razin A. and Cedar H. **Microbiological Reviews**, 451, 1991.
45. Palmgren G., Mattson O. and Thyge F. **Biochemica et Biophysica Acta**, **1049**, 293, 1990.
46. Arnold- Scmitt B. **Theor. Appl. Genet.**, **85**, 793, 1993.
47. Vasil I.K. **J. of Plant Physiol.**, **128**, 193, 1987.
48. Senaratna T. **Biotech. Adv.**, **10**, 379, 1992.
49. Rotanal N. y Duran J.M. **Simp. Nac. de Semillas. Sevilla Agrícola Vergel**, 484, 1989.
50. Jefferson R.A. **Biotech. and Develop. Monitor.**, **19**, 14, 1994.
51. Mazzucato A., Barcaccia G., Pezzotti M. and Falcinelli M. **Sexual Plant Reproduction**, **8**, 133, 1995.