

ANATOMÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LA FMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ONOTO ¹

Claret C. Michelangeli de Clavijo*, Paola I. Artioli G** y Ada M. Medina M.**

1 Trabajo financiado por el FONACIT

*Directora CIBA

**Asistentes de Investigación CIBA

RECIBIDO: mayo 16, 2002

RESUMEN

Con la finalidad de estudiar el proceso de la embriogénesis somática (ES) en onoto, *Bixa orellana* L., a partir del cultivo de anteras, se realizaron estudios anatómicos y ultraestructurales (microscopía electrónica de barrido) a callos embriogénicos y no embriogénicos, así como a ES en cuatro estados de crecimiento: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Para los estudios anatómicos, las muestras fueron fijadas en FAA 70%, deshidratadas en una serie creciente de etanol-terbutanol, inmersas en parafina, seccionadas entre 5 y 24 mm y teñidas en Safranina-Fast Green. Para los estudios ultraestructurales, las muestras fueron fijadas en FAA 70%, deshidratadas en una serie creciente de etanol, secadas hasta su punto crítico, realizándose un cubrimiento iónico-metalización con oro. La masa embriogénica-presentó ES globulares con células de forma redondeada, pared relativamente gruesa, citoplasma denso y núcleo prominente. Posteriormente, se desarrollaron los estados de torpedo y cotiledonares, caracterizados por el alargamiento del eje hipocótilo-radícula y la expansión de los cotiledones, respectivamente. También se observaron embriones secundarios y anomalías, con formación de numerosos cotiledones fusionados en roseta.

Palabras Clave: Anatomía; *Bixa orellana*; embriones somáticos; MEB; ultraestructura; anteras.

INTRODUCCIÓN

El onoto, *Bixa orellana* L., es un árbol perenne, generalmente de porte bajo y copa compacta. Las hojas son grandes, alternas, sencillas, de borde liso y ápice acuminado. Las flores se agrupan en panículas terminales, son hermafroditas, rosadas o blancas, con cinco sépalos, cinco pétalos y numerosos estambres (más de 100).

El ovario es elevado por un ginóforo y adopta la apariencia de un ovario súpero, con rudimentos seminales que varían de 10 a 60 por fruto. Los estambres son numerosos con anteras arqueadas en forma de herradura, cuya dehiscencia se efectúa por pequeñas hendiduras laterales. Los filamentos son delgados, de color blanco, amarillo y violeta. Los grupos de polen son tricolpados y redondeados. Contiene nectarios florales en la base de los sépalos externos (Rivera y Flores, 1988). La apertura de las flores se inicia entre las 4:00 y 5:00 am y el grano de polen permanece viable por un período de 10 a 11 horas (Rodríguez y Enriquez, 1983). Es una especie alógama con un alto porcentaje de polinización cruzada que se propaga principalmente por semillas, como consecuencia esto trae una variabilidad en la descendencia expresada en

variedad de formas, tamaño y coloración en las cápsulas (Arce Portuguez, 1983; Barreto, 1974).

Su semilla presenta un alto contenido de bixina utilizada ampliamente como colorante natural en las empresas procesadoras de alimento, cosméticos y ungüentos (Arce Portuguez, 1983). Es utilizado para la coloración de productos lácteos como queso, mantequilla, yogur y helados, ya que por ser insípido no altera el sabor de los alimentos (Rivera, 1968; Barreto, 1974). Además es mundialmente usado en la industria para la preparación de alimentos enlatados (salsas, conservas de pescado, aceite comestible, carnes) y en embutidos. También puede emplearse en raciones alimenticias para pollos de engorde y gallinas ponedoras ya que, además de servir como fuente de vitamina A, mejora el color de la yema de los huevos (Barreto, 1974).

El cultivo del onoto ha cobrado gran interés comercial por el mercado internacional, presentándose como una alternativa en la sustitución de colorantes artificiales usados en productos alimenticios. La exclusión de muchos colorantes artificiales ha incrementado su valor comercial porque es un producto seguro, económico y fácil de usar y se considera el segundo colorante natural más importante mundialmente después del caramelo. Su importancia económica justifica la realización de estudios que permitan obtener materiales con características agronómicas importantes como una mayor producción de pigmentos, colores uniformes y cápsulas indehiscentes, entre otros.

Con el desarrollo de técnicas *in vitro*, en especial la embriogénesis somática, (embriones somáticos ES), a partir del cultivo de anteras, se puede lograr la producción de plantas homocigotas, que en cultivos perennes como el onoto, aceleraría la obtención de individuos mejorados genéticamente. Cuando se usan como explante tejidos de anteras y/o microsporas, sea con fines de mejoramiento o propagación, se hace necesario evaluar el material que sirve como fuente de explante para determinar su nivel de ploidía. Actualmente, se cuenta con información en este sentido ya que en un estudio citogenético en onoto, se confirmó el número cromosómico haploide de $n=8$ cromosomas a partir de células madre de las microsporas en metafase I (Michelangeli *et al.*, 2002b) y es un cultivo con nivel de ploidía $2x=16$ (Darlington y Wylie, 1955).

Como ES se han definido los iniciados a partir de células (haploides o somáticas) que no son el producto de la fusión de gametas. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical sin conexión vascular con el tejido materno, capaces de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret; 1991; Williams y Maheswaran, 1986). Este sistema permite propagar líneas de selección, regenerar tejidos transformados, así como producir los productos de manipulaciones genéticas. También, la similitud del ES con aquel producido en la semilla ha permitido que se desarrollen plantas de crecimiento y desarrollo igual, como si proviniera de una semilla sexual, permitiendo a su vez, la producción en gran escala de plantas híbridas sin que haya problemas de segregación.

Los estudios anatómicos y ultraestructurales de la ES sirven de estrategia para los estudios básicos relacionados con la fisiología y desarrollo del embrión, ya que permiten conocer el proceso, incluyendo la formación inicial de callo embriogénico, origen de los embriones, características morfológicas y estructurales; permitiendo además diferenciar las células embriogénicas (ce) de las no embriogénicas (cne) y los embriones en diferentes estado de desarrollo. El microscopio electrónico de barrido (MEB) tiene un amplio rango de aplicación, pudiéndose observar imágenes en detalle, tridimensionales y de alta resolución mediante el uso de técnicas sencillas.

La anatomía y ultraestructura de un material está determinada por su organización interna. La integración de estos niveles y la interacción del explante con el ambiente (medio del cultivo) permite una mejor comprensión del proceso de ES, en el cual

ocurre intercambio continuo de energía y sustancias químicas que pueden modificar el metabolismo celular, observándose una marcada diferencia en los rasgos morfológicos. En la actualidad, se cuenta con un protocolo de regeneración de plántulas mediante esta técnica, el cual ha sido probado eficientemente en varios genotipos (Michelangeli *et al.*, 2002a).

El conocimiento de los eventos morfogénicos que ocurren durante la ES permitiría mejorar la eficiencia de este proceso en onoto y aplicar métodos biotecnológicos para permitir la mejora agronómico de esta especie productora de pigmentos en un tiempo corto. En tal sentido, el trabajo tiene por objetivo estudiar las características más relevantes de la ES en onoto anatómica y ultraestructuralmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) y en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía (CenMEFA) de la Universidad Central de Venezuela.

Material Vegetal

Se utilizaron ES en cuatro estados de crecimiento (globular, corazón, torpedo y cotiledonar), obtenidos a partir de cultivo de anteras (separadas en tecas) procedentes de botones florales de onoto en estado uninucleado. Los botones fueron tomados de plantas adultas en su 3^{er} año de floración, del genotipo identificado como 41 originario de Portuguesa, ubicado en el jardín de onoto existente en el Campo Experimental de Agronomía de la Facultad de Agronomía. Adicionalmente y con fines de comparación, se utilizaron embriones cigóticos (EC) obtenido de semilla inmadura. Para el proceso de desinfección, medios de cultivo (inducción de callo, inducción, transferencia y germinación de embriones) así como la siembra de las anteras se siguió el protocolo obtenido por Michelangeli *et al.* (2002a).

Estudios anatómicos

Inicialmente se observó la condición de las masas de callo obtenidas a los 21 días de cultivo en medio de inducción. Para ello, muestras de callos se colocaron (teca engrosada) sobre portaobjetos, añadiendo una gota de carmín propiónico 2% en cada muestra. Seguidamente se pasaron sobre la llama de un mechero, evitando su ebullición y eliminando el colorante con un papel secante; repitiendo este proceso tres veces consecutivas. Nuevamente se agregó una gota de colorante, presionando con una vara de vidrio. Con la ayuda de una pinza se extrajo el exceso de tejido, añadiéndole otra gota de colorante, colocándose el cubreobjeto, retirando el exceso y sellándolo de forma semipermanente con esmalte transparente para uñas. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico con un aumento máximo de 1600X, tomándose fotografías.

Para los estudios anatómicos se fijaron muestras de callo embriogénico y no embriogénico de 0,5 cm de diámetro, ES en estado torpedo y cotiledonar y EC en FAA 70% (ctanol 70% -ácido acético- formol aldehído) y deshidratados en una serie de etanol-terbutanol con una duración de 1 h cada uno. Seguidamente, se realizó una inclusión de las muestras con Paraplast Plus, dejándolo en una estufa a 60 °C durante 48 h hasta formar un bloque que posteriormente fue cortado en 6 espesores (5, 10, 15, 20, 22 y 24 m m) con la ayuda de un micrótopo.

El proceso de tinción empleado fue el de contraste Safranina - Fast Green y finalmente se procedió al montaje permanente con Bálsamo de Canadá. Los registros fotográficos

fueron realizados con un microscopio óptico, marca Nikon y en cámara digital marca Pixera, modelo Pro 150 ES, adosada a una computadora para la obtención de imágenes digitales.

Estudios ultraestructurales (MEB)

Se fijaron porciones de callo embriogénico y no embriogénico, masas de ES en diferentes estados de desarrollo, ES individuales en estado de torpedo y cotiledonar y EC en FAA 70%. Después de fijado, el material se mantuvo refrigerado por un lapso de 2 a 3 meses.

Seguidamente, se deshidrataron en una serie creciente de etanol por un período de 5 min cada uno. Posteriormente, el material fue identificado y colocado en una cesta de metal para ser secado hasta su punto crítico. Se colocaron sobre una base con cinta doble adherente, para realizarles un cubrimiento iónico - metalización con oro (Sputter coater), marca BAL-TEC modelo SCD-050. Las observaciones se efectuaron con un microscopio electrónico de barrido marca Phillips, modelo XL20. El MEB permitió observar la superficie de los callos embriogénicos y no embriogénicos así como la morfología de los ES.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios anatómicos

En las observaciones realizadas a las tecas a los 21 d de cultivo en medio de inducción, se observaron masas de callo con ce y cne (Figura 1 a). Las cne se caracterizaron por ser alargadas, de paredes delgadas, citoplasma poco denso, individualizadas y muy poco coloreadas. Las ce se presentaron de forma redondeada, con paredes relativamente gruesas, citoplasma denso, núcleo prominente y coloración rojo intenso; caracteres típicos de células meristemáticas y proembriogénicas (Figura 1b-d). Estas características también han sido descritas en otros cultivos (Dussert *et al.*, 1995).

Posteriormente estas células comenzaron a dividirse manteniéndose limitadas por una pared relativamente gruesa dando así inicio a los ES (Figura 1e), demostrándose el origen unicelular de los embriones. En café, también se ha evidenciado este origen unicelular debido a la presencia de una pequeña pared engrosada con citoplasma denso y núcleo prominente, por lo que la célula inicia un ciclo de división para formar un pro embrión bicelular (Menéndez y García, 1993). Sin embargo, en coco se ha observado el origen tanto unicelular como pluricelular de los ES dependiendo de la raza utilizada (Dussert *et al.*, 1995). Por divisiones sucesivas, los callos embriogénicos cultivados en medio de inducción durante 120 d aproximadamente, mostraron la formación de embriones en diferentes estados de desarrollo (globular, corazón, torpedo y cotiledonar).

Los proembriones se observaron inicialmente creciendo en la masa embriogénica, individualizándose posteriormente como estructuras esféricas, variables en forma y tamaño originadas de células individuales de la superficie del callo embriogénico, representando las fases iniciales de los ES globular y corazón (Figura 2a-d).

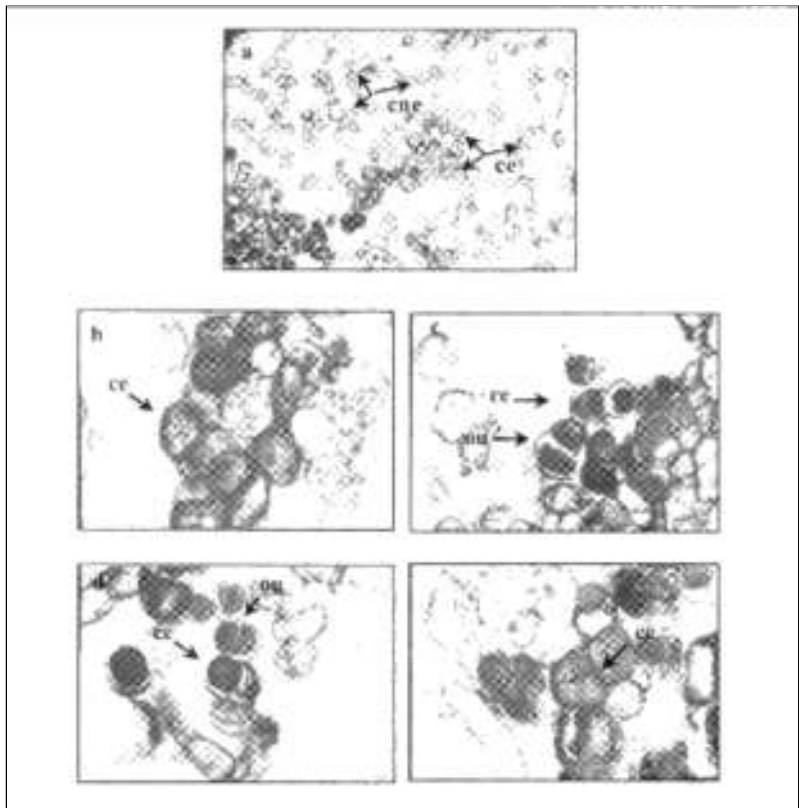


FIGURA 1. Callo embriogénico de onoto cultivado en medio para inducción de embriogénesis somática utilizando como explantes tecas de anteras; (a) células embriogénicas (ce) y no embriogénicas (cne); (b) ce claramente diferenciadas por su intensa coloración rojiza; (c, d, e) ce con gran actividad mitótica, observándose además el origen unicelular de los embriones (ou).

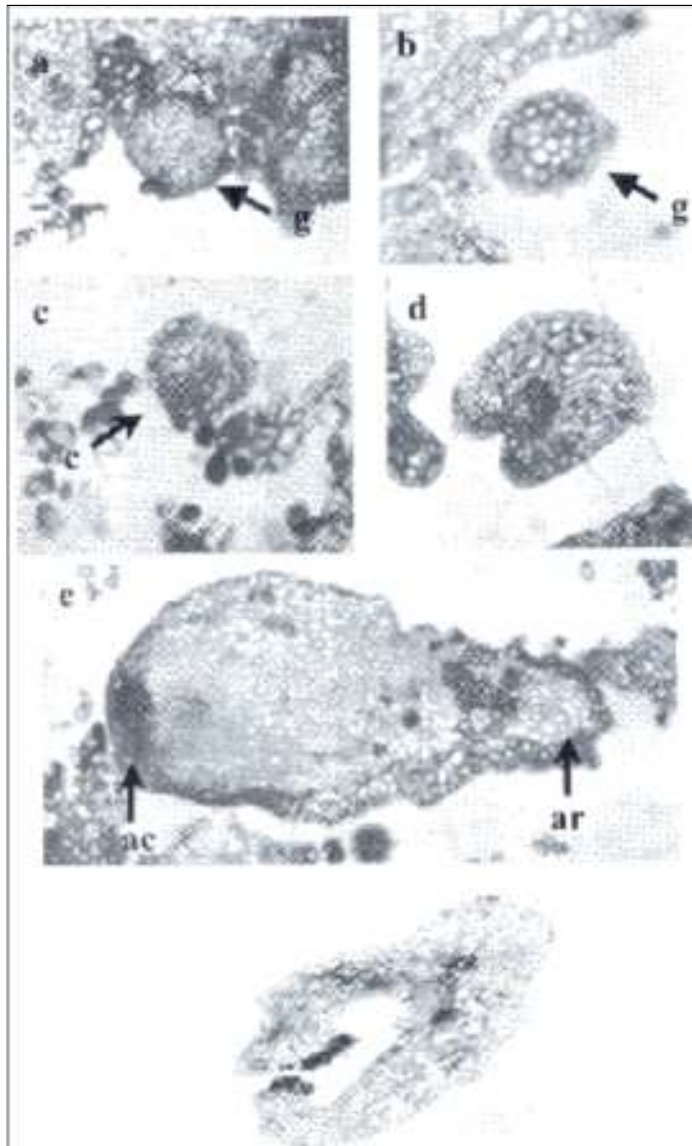


FIGURA 2. Cortes histológicos de la formación de embriones somáticos en onoto; (a) embrión en estado globular (g) creciendo en la superficie del callo embriogénico; (b) embrión en estado globular (g) individualizado; (c) fase temprana de embrión en estado de corazón (c); (d) embrión en fase de corazón; (e) embrión en fase de torpedo; observándose claramente el ápice caulinar (ac) y el radicular (ar); (f) embrión en estado cotiledonar.

Durante la embriogénesis, la transición de la etapa globular a corazón es una señal de simetría bilateral, la cual se caracteriza por el cese del crecimiento uniforme y por la iniciación de los dos cotiledones. En este punto, la división celular ocurre predominantemente en las porciones cotiledonares, mientras que las células presentes entre los cotiledones, cesan su división (Tykarska, 1979). Liu *et al.* (1993) presentaron evidencias de que el establecimiento de la simetría bilateral es debida al transporte polar auxínico. El alargamiento del eje hipocótilo-radícula definió la forma de torpedo, observándose claramente la diferencia entre el ápice radicular (teñido de azul) y el ápice caulinar de color rojo intenso, relacionado con el ápice meristemático (Figura 2e). Asimismo, la expansión y separación de los cotiledones marcó la fase cotiledonar, donde se observaron claramente los dos cotiledones y la zona del meristema apical con gran actividad mitótica, teñida de rojo oscuro (Figura 2f

).

De esta manera los estudios anatómicos revelaron que los ES globulares se desarrollaron hacia la forma de corazón con primordios cotiledonares separados, los cuales consecuentemente maduraron hacia la formación de cotiledones bien desarrollados. Cada uno de estos estadios fueron histológicamente similares a las formas embriogénicas descritas para café (Menéndez y García, 1997) tabaco (Gill y Saxena, 1993), batata (Zheng *et al.*, 1996) y dicotiledóneas en general. Las secciones longitudinales a través de los embriones en todos los estados de desarrollo revelaron la ausencia de conexiones vasculares entre los tejidos embrionarios y los tejidos parentales subyacentes.

Estudios ultraestructurales (MEB)

Los callos embriogénicos y no embriogénicos observados al MEB mostraron una marcada diferencia en cuanto al tipo de células desarrolladas. Las células redondeadas, típicas de callo embriogénico (Figura 3a-b) y las alargadas denominadas cne (Figura 3c).

En la fase inicial de formación del callo (con uso de medio de inducción), se evidenciaron ambos tipos de células. En estudios sobre la ES realizados en café, las observaciones con el MET mostraron que el callo no embriogénico estuvo compuesto tanto de células alargadas como redondeadas dispuestas de forma imprecisa con grandes vacuolas y paredes delgadas (Menéndez y García, 1997).

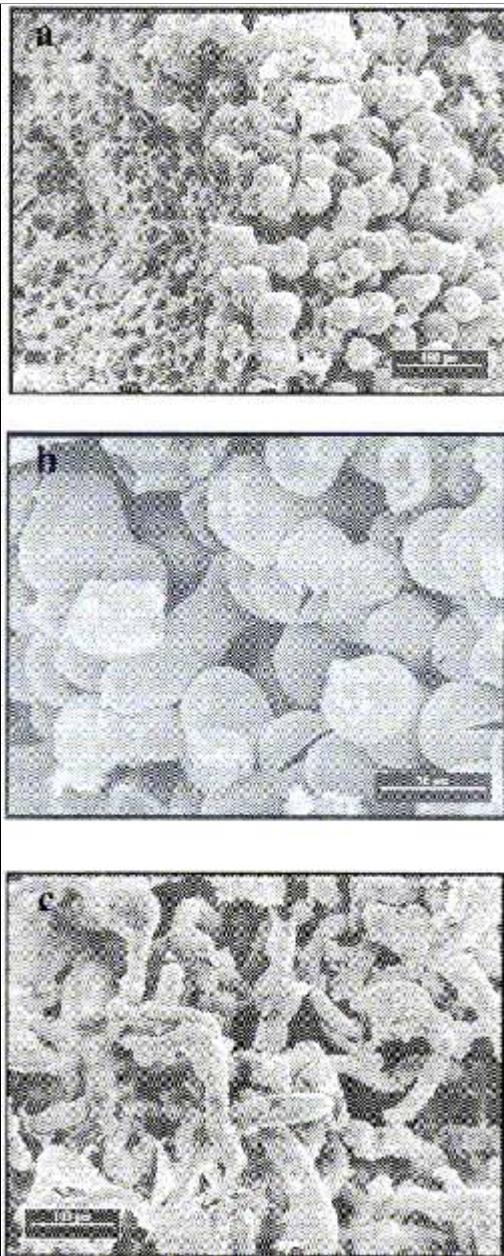


FIGURA 3. Callo embriogénico y no embriogénico obtenido a partir de anteras de onoto, vistas con el microscopio electrónico de barrido (MEB); (a, b) células redondeadas típicas de callo embriogénicos; (e) callo no embriogénico conformado por células alargadas.

Posteriormente, en el medio de inducción de embriones, se incrementó la cantidad de ce y el desarrollo subsiguiente de ES.

Al comparar aspectos ultraestructurales de los ES obtenidos mediante el cultivo de anteras con EC obtenidos de semillas inmaduras, se encontró que ambas estructuras poseen un eje caulinar bien definido con hojas cotiledonares y un eje radicular similar (Figura 4a-b).

En ciertos aspectos, los ES mantienen una similitud con los EC (Litz y Jarret, 1991); en general, ambos procesos son morfológicamente idénticos o muy

similares desde la etapa globular en adelante, presentándose las etapas características típicas posteriores de corazón y torpedo (Menéndez, 1993). Estas similitudes han sido señaladas en cultivos como el café (Menéndez y García, 1997), batata (Zheng *et al.*, 1996), entre otros.

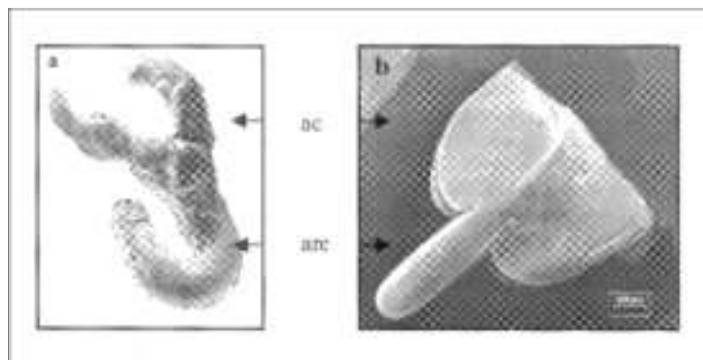


FIGURA 4. Embrión somático y cigótico de onoto observados en microscopio electrónico de barrido (MEB); (a) embrión somático obtenido a partir de cultivo de anteras mostrando el eje caulinar (ac) con desarrollo de ambos cotiledones y el eje radicular (ar); (b) embrión cigótico, donde se observa el ápice caulinar (ac) con cotiledones expandidos y el radicular (ar) con hipocótilo bien definido.

En onoto, además de los ES normales obtenidos (Figuras 5a-c), también se observaron formaciones de embriones secundarios en diferentes estados de desarrollo (Figura 5d). Generalmente, esto se ha atribuido a que la embriogénesis en células cultivadas es altamente repetitivo y los ES pueden producir embriones adicionales más pequeños a lo largo de su eje ya que la diferenciación ocurre asincrónicamente (Menéndez, 1993), hecho que también se presenta en otros cultivos (Zhen *et al.*, 1996).

Por otra parte, en onoto se evidenció la presencia de embriones anormales de forma arrepollada con numerosos cotiledones fusionados en roseta (Figura 5e). Estructuras similares a esta fueron observadas en yuca (Stamp, 1987) y se han observado otras anomalías como ejes caulinares ramificados, cotiledones múltiples, dos ejes caulinares, fasciación, estructuras claviformes, entre otros (George, 1993; Chi *et al.*, 1994; Litz y Jarret, 1991; Rugini y Caricato, 1995).

En el trabajo, el estudio anatómico y ultraestructural del proceso de la ES en onoto a partir del cultivo de anteras permitió sentar las bases para mejorar la comprensión de este proceso, lo cual servirá para ampliar el uso de este sistema en aplicaciones biotecnológicas de avanzada como la ingeniería genética. Además, contribuirá a evaluar tempranamente la capacidad embriogénica de tejidos en distintas condiciones fisiológicas y podría servir para probar las capacidades fisiológicas de regeneración de distintos genotipos de onoto.

Sin embargo, aunque se cuenta con un protocolo de regeneración de plántulas de onoto mediante la ES, sería de gran interés determinar el nivel de ploidía de los ES y plantas de onoto obtenidas por el cultivo de anteras. Estudios citogenéticos de esta índole determinarán si las plántulas regeneradas por esta vía son haploides, como resultado de haberse originado de las microsporas; o diploides, como consecuencia ya sea, de una duplicación espontánea de los cromosomas en las primeras etapas de desarrollo de callo y

de regeneración de la planta, o por resultar de los tejidos de la pared de la antera (Roca *et al.*, 1991).

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Ing. José Azkue del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía (CenMEFA) por su valiosa colaboración en la toma de fotografías.

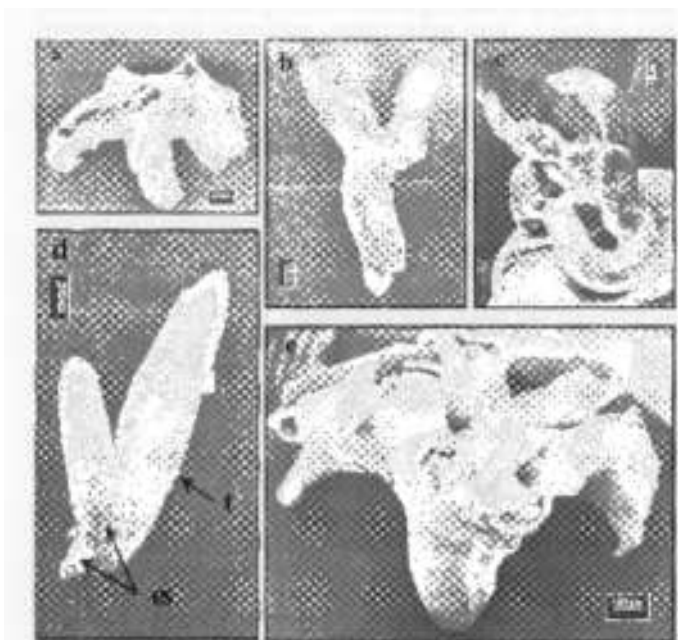


FIGURA 5. Embriones somáticos de onoto vistos en el microscopio electrónico de barrido (MEB); (a, b,) embrión cotiledonar con clara definición de ambos ejes; (e) embrión cotiledonar en estado avanzado de desarrollo; (d) embrión torpedo (t) con el desarrollo de embriones secundarios (es); (e) embrión anormal con múltiples cotiledones fusionados (arrepollado).

SUMMARY

With the purpose of studying somatic embryogenesis process of annatto, *Bixa orellana* L., from anther culture, anatomical and ultrastructural studies (scanning electron microscopy) were performed of embryogenic and non embryogenic callus, as well as somatic embryos in four growing stages globular, heart, torpedo and cotyledonary. For anatomical studies, the samples were established in FAA 70%, dehydrated in a graded ethanol - terbutanol increasing series, immersed in paraffin, sectioned between 5 and 24 μ m and stained with safranin - fast green. For the ultrastructural studies, the samples were established in FAA 70%, dehydrated in a graded ethanol series, dried to critical point and covered with gold with an ionic- metallization procedure. The embryogenic tissue was characterized by round cells, relative thick walls, dense cytoplasm and prominent nuclei. Later, torpedo and cotyledonary stages were developed, characterized by hypocotyl and radicle axis' enlargement and cotyledon expansion, respectively. The formation of secondary embryos and anomalies were observed, with formation of many

cotyledons joined together in a small rose way.

Key Words: Anatomy; anthers; *Bixa orellana* L.; somatic embryos; SEM; ultrastructure.

BIBLIOGRAFÍA

- ARCE PORTUGUEZ, J. 1983. El achiote: Cien generalidades sobre el cultivo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Actividades en Turrialba, Costa Rica. 11(4):6-8.
- BARRETO, C. 1974. El cultivo del onoto. Fundación Servicio para el Agricultor, Estación Experimental Cagua. 15 p.
- CHI, C., H. VITS, J. ESTABA, T. COOKE and W. HU. 1994. Morphological kinetics and distribution in somatic embryo cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 44:368-378.
- DARLINGTON, C. and A. WYLIE. 1955. Chromosome Atlas of flowering plants. George Allen & Unwin LTD, 2nd Ed., London. 524 p.
- DUSSERT, S., J. VERDEIL and J. BUFFARD. 1995. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. *Plant science* 111:229-236.
- GEORGE, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1 The technology. Exegetics Ltd., 2nd edition. Great Britain. 574 p.
- GILL, R. and P. SAXENA 1993. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports* 12: 154-159.
- LITZ, R. y R. JARRET 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. William Roca y Luis Mroginski (eds.) CIAT. Cali, Colombia. 969 p.
- LIU, C., Z. XU and N. CHUA. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5:621-630.
- MENÉNDEZ, A. 1993. Estudio de los eventos morfogénicos en la embriogénesis somática del café. Tesis de grado. Caracas, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. 169 p.
- MENÉNDEZ, A. and GARCÍA, E. 1997. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee 'Catimor'. *Protoplasma* 199: 208-214.
- MICHELANGELI de CLAVIJO, C., P. I. ARTIOLI, A. MEDINA y J. MATA. 2002a. Microsporogénesis y microgametogénesis de onoto (*Bixa orellana* L.). *Acta Científica Venezolana* 53: (en prensa).
- MICHELANGELI de CLAVIJO, C., P. I. ARTIOLI y A. MEDINA. 2002b. Embriogénesis somática en onoto a partir del cultivo de anteras. *Agronomía Trop.* 52(4):523-54 1.

- RIVERA, D. y E. FLORES. 1988. Biología Floral de *Bixa orellana* L., (Bixaceae). Revista de Biología Tropical. 36(2B):499-509.**
- RIVERA, R. 1968. El achiote: Una promesa para El Salvador. Dirección General de Investigaciones Agronómicas, circular N° 80. Santa Tecla, El Salvador. 15 p.**
- ROCA, W., V. NÚÑEZ y K. MORNAN. 1991. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. In: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds). CIAT, Cali, Colombia. pp. 271-294.**
- RODRÍGUEZ, R. y G, ENRÍQUEZ. 1983. Estudio preliminar del desarrollo de ramas y la biología floral en *Bixa orellana*. In: Aspectos sobre el achiote y perspectivas para Costa Rica. Trabajos presentados. Editado por J. Arce. Informe técnico no. 47. pp 58-76. (CATIE: Serie Técnica).**
- RUGINI, E. and G CARICATO. 1995. Somatic embryo genesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Moraiolo'. Plant Cell Reports 14: 257-260.**
- STAMP, J. 1986. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. Annals of Botany 59:451-457.**
- TYKARSKA, T. 1879. Rape embryogenesis II. Development of embryo proper. Acta Soc. Bot. Pol. 48:391-421.**
- WILLIAMS, E. and B. MAHESWARAN. 1986. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviors of cells as an embryogenesis group. Annals of Botany 57:443-462.**
- ZHENG Q., A. POROBO and C. PRAKASH. 1996. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. Plant cell reports 15:381-385.**

