

Nota Técnica

EFFECTO DEL TIOSULFATO DE PLATA SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y LA SEMILLA ARTIFICIAL DE CAÑA DE AZÚCAR

Nadina Nieves^{1/}*, Mariela Cid*, Danilo Pina*, Yarianne Lezcano*, José María Torne**.

Palabras clave: Alginato, cultivo *in vitro*, embrión somático, embrioide.

Keywords: Alginate, *in vitro* culture, somatic embryo, embryoid.

Recibido: 18/01/2007

Aceptado: 14/09/2007

RESUMEN

El trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del tiosulfato de plata (STS) sobre la embriogénesis somática y la semilla artificial de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) var. CP-5243 y su relación con los mecanismos de acción del etileno. Los callos se obtuvieron a partir de segmentos de 1 cm de hojas de plantas de campo. Se aplicó 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de STS. En todas las etapas de desarrollo del embrioide, excepto en los germinados, el STS superó al control en el proceso de diferenciación, mientras que en la semilla artificial tuvo un efecto adverso sobre la calidad de la germinación de los mismos. Los niveles de acumulación de Ag^{3+} , causados por el STS, no debieron sobrepasar el umbral de tolerancia para la embriogénesis somática, pero se acumularon en niveles tóxicos dentro de la cápsula de alginato.

ABSTRACT

Effect of silver thiosulfate on somatic embryogenesis and artificial sugarcane seeds.

An evaluation of the effect of silver thiosulfate's (STS) on somatic embryogenesis and artificial seeds of sugarcane (*Saccharum* spp.) var. CP-5243 was the aim of this work. Calli were obtained from 1 cm leaf segments from field plants. STS was applied at 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. In all embryoid development stages, except in the case of germinated embryoids, treatments with STS showed better results than the control, whereas in artificial seeds the effect was adverse on embryoids' germination quality. Accumulation of Ag^{3+} , promoted by STS, should not have surpassed the tolerance threshold for somatic embryogenesis from callus, but accumulated to toxic levels inside the alginate capsule.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (Poaceae), principalmente los híbridos interespecíficos del complejo aneuploide/poliploide de *Saccharum officinarum* y *S. spontaneum* (Irvine 1999), es uno de los principales cultivos de interés agrícola, que provee cerca del 75% de la producción mundial de azúcar (World Sugar Statistics 2005). Es

además, uno de los cultivos con mayor eficiencia en biomasa, que se adapta tanto a condiciones tropicales como subtropicales y se proyecta en la actualidad como biofábrica, con potencial para la producción de biomasa, azúcar, y otros productos industriales de alto valor (Nonato *et al.* 2001, McQualter *et al.* 2004, Lakshmanan *et al.* 2005).

1/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: nnieves@bioplantas.cu

* Centro de Bioplantas. Carr. a Morón km 9, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba.

** Departamento de Genética Molecular. IBMB. Consorcio CSIC-IRTA. Jordi Girona 18-26. 08034 Barcelona. España.

La caña de azúcar puede ser propagada de forma sexual por semillas, aunque esta vía es utilizada sólo con fines genéticos, y por vía asexual a través de estacas (Heinz y Osgood 1994). El manejo de semilla, básica o registrada, con calidad se ve limitado por la demanda de grandes áreas para los bancos de semilla, así como el alto consumo de mano de obra e insumos para las exigencias del cultivo y el consumo de material que se desvía hacia la industria. Por otra parte, la introducción de variedades con alto potencial productivo y resistentes a enfermedades, o simplemente saneadas, es muy lento. Una alternativa para dar solución a esta problemática es su propagación clonal a través de meristemos o yemas axilares *in vitro* y la producción masiva de embriones somáticos. La producción de embriones somáticos tiene una aplicación importante en la semilla artificial para estudios básicos en diferentes cultivos (Germaná 2003, 2007, Ipekci y Gouzukirmizi 2003, Zhang *et al.* 2006).

La embriogénesis somática es una herramienta que ha permitido obtener embriones a partir de células somáticas, y constituye además uno de los mecanismos donde se pone de manifiesto la totipotencia celular. Los embriones somáticos pueden ser obtenidos de forma masiva por vía directa o indirectamente a partir de células, callos u órganos (Guiderdoni *et al.* 1995).

El etileno (C₂H₄) es una hormona producida por la mayor parte de las plantas superiores a una tasa variable, de acuerdo con el tejido, el órgano en cuestión y su estado de desarrollo (Lieberman 1979). Esta hormona tiene influencia en el crecimiento y diferenciación de las plantas, como la germinación, la maduración de frutos, la señalización de la muerte celular, la formación de aerénquimas, la variación de los índices de crecimiento (Morgan y Drew 1997), y en el cultivo *in vitro* (Hays *et al.* 2000), aunque sus efectos en este caso pueden ser inhibir o mejorar la eficiencia, dependiendo de la especie (Biddington 1992).

Varios reguladores del crecimiento de las plantas influyen en la biosíntesis del etileno, por ejemplo, el ácido abscísico, las citocininas, las

auxinas, los metil-jasmonatos, los brasinoesteroides y las poliaminas. También variaciones del medio natural, en el cual la planta se inserte, pueden provocar cambios en su metabolismo (Mttou *et al.* 1991).

Se conoce que en cultivos celulares de zanahoria, los inhibidores de la ACC sintetasa [el aminoethoxy-vinyl-glycina (AVG) y el ácido amino-oxyacetico (AOA)], inhibieron tanto la embriogénesis como la producción de etileno; sin embargo, la inhibición de la embriogénesis no estuvo relacionada con la inhibición de la producción de etileno. Mientras que otro inhibidor de la acción del etileno (AgNO₃) a bajas concentraciones, inhibió la embriogénesis, pero estimuló la producción de etileno (Nissen 1994).

En estudios realizados por Atkins *et al.* (2005), para demostrar la importancia del etileno sobre la embriogénesis somática en callos cultivados de coco (*Cocus nucifera* L.) y papaya (*Carica papaya* L.), ellos emplearon aditivos en el medio que pudieran reducir la producción de etileno (AVG), proteger contra su acción (STS) o ayudar a combatir el estrés producido por el etileno (poliaminas), conocidas competidoras de sus vías biosintéticas a través de la S-Adenosil metionina. Los incrementos en la concentración de etileno en el coco redujeron el crecimiento de los callos y la embriogénesis somática. El AVG (2 µM) y el STS (3 µM) mejoraron la embriogénesis somática en 100 y 67%, respectivamente. Mientras que la embriogénesis somática fue promovida al 100% por la adición de poliaminas [putrescina (7,5 mM) y espermina (1 µM)]. De forma similar, los callos de papaya crecieron mejor en la presencia de STS (50 µM) y se promovió la embriogénesis somática. El STS (1 µM) ayudó a la proliferación, maduración y germinación de los embrioides.

En la embriogénesis somática de *Araujia sericifera*, a partir de pétalos, se estudió la influencia de la 6-benzyladenina y el ácido α -naphthalene acético, así como la intensidad de la luz (90 ó 5 µmol m⁻² s⁻¹) y el tiosulfato de plata (inhibidor de la acción del etileno). La 6-benzyladenina indujo una respuesta eficiente, pero las

dosis altas incrementaron la callogénesis y redujeron la embriogénesis, la cual se vio favorecida por la alta intensidad de la luz (90–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La presencia de STS en el medio redujo la inducción de embrioides (Torné *et al.* 1997).

El trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del tiosulfato de plata sobre la embriogénesis somática y la semilla artificial de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) var. CP-5243 y su relación con los mecanismos de acción del etileno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp) var CP-5243, un híbrido proveniente de CP-4364 x CP-3834, Canal Point, FL, USA. El establecimiento de los callos se realizó a partir de segmentos de hojas de 1 cm, de la parte más interna y más próxima a la zona meristemática, de plantas cultivadas en el campo. El cultivo de callos con estructuras embriogénicas se inició en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (13,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$) durante 30 días. Los callos se subcultivaron cada 15-20 días en un medio MS suplementado con arginina (0,28 mol l^{-1}) y 2,4-D (4,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$). El pH del medio se ajustó a 5,7 previo a la esterilización. Los medios se gelificaron con 2,5 g l^{-1} de agar.

Los tratamientos fueron:

- a. Control.
- b. Tiosulfato de plata (STS) (7 $\mu\text{mol l}^{-1}$).

La selección de la dosis de STS se realizó teniendo en cuenta las experiencias anteriores reportadas en la literatura.

El tiosulfato de plata se preparó a partir de una solución stock de tiosulfato de sodio 0,1 mol l^{-1} (1,58 g en 100 ml de agua destilada estéril) y una solución stock de nitrato de plata 0,1 mol l^{-1} (1,7 g en 100 ml de agua destilada estéril). Ambos stocks se almacenaron en oscuridad hasta el momento de preparar el STS.

La plata presente en la solución es en forma de $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{2-}$, el complejo activo para la inhibición del etileno.

El experimento inició a partir de la fase de inducción, en la cual los explantes de hojas se colocaron sobre ambos medios. Los subcultivos siguientes también se realizaron en los mismos tratamientos. En la fase de diferenciación y maduración de los embrioides, los callos se colocaron en el medio descrito por Tapia *et al.* (1999), el cual contiene el medio basal MS, suplementado con ácido naftalen acético (ANA) (5,37 $\mu\text{mol l}^{-1}$) y sacarosa (60 g l^{-1}). En esta etapa también se mantuvo el STS en el medio. Los callos se mantuvieron por 7 días en la oscuridad y posteriormente se pasaron a la luz para hacer el conteo y clasificación de los embrioides a los 14 días y realizar el proceso de encapsulado descrito por Nieves *et al.* (1998).

Los embriones somáticos utilizados para la encapsulación se cosecharon en estado escutelar tardío y con coloración verde. Los embriones encapsulados en perlas de alginato de calcio, en las cuales se mantuvo la secuencia de los tratamientos, se dejaron germinar en condiciones estériles sobre el medio basal MS en placas de Petri. A los 15 días se evaluó la germinación de los embrioides. Se consideró un embriode germinado aquel con al menos una raíz y una hoja fuera de la cápsula.

El diseño utilizado fue completamente aleatorizado. En la etapa de inducción se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento (placas de Petri) con 8 explantes cada placa. En la evaluación del efecto en la semilla artificial se encapsularon 100 embriones por tratamiento, los que se colocaron en grupos de 10 en las placas de Petri. Para el análisis estadístico de los resultados se empleó Statistical Package for Social Sciences (SPSS) para Windows, versión 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997. Se realizó la transformación de los datos en porcentaje, la prueba de Mann-Whitney para evaluar la desviación estándar, y la prueba T para un grado de confiabilidad del 5% (n=40).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las figuras 1 y 2 muestran las características de los callos control y tratados con STS, así como la clasificación de los embriones somáticos a los 14 días en el medio de diferenciación, respectivamente.

Como se aprecia en la figura 1, la presencia del STS en el medio provocó un incremento en el tamaño de los callos, acompañado de un aumento en el número de embriones somáticos producidos.

La figura 2 permite apreciar que en todos los estadios de desarrollo del embrión, excepto en los germinados, el STS superó significativamente

al control, con una cifra total que casi supera los 20 embrioides por 50 mg de callo.

Según la literatura, la presencia de etileno es importante para la embriogénesis de *Hordeum vulgare* a partir del cultivo de anteras (Cho y Kasha 1989) y para la formación de yemas florales de explantes de capa fina de *Nicotiana tabacum* (Smulders *et al.* 1990). En contraste, el etileno inhibió la regeneración de brotes a partir de callos cultivados de *Helianthus annuus* (Paterson-Robinson y Adams 1987) y de *N. tabacum* (Huxter *et al.* 1981). El uso de inhibidores de la acción del etileno, como por ejemplo el AgNO₃, el norbornadiene, y el CoCl₂ promovieron la regeneración de brotes a partir de callos cultivados

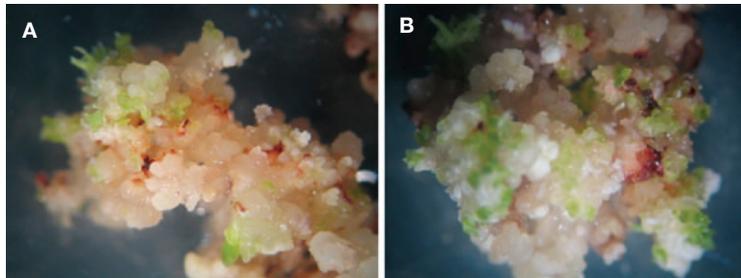


Fig. 1. Callos de caña de azúcar a los 14 días en medio de diferenciación. A) Control, B) Tratados con STS.

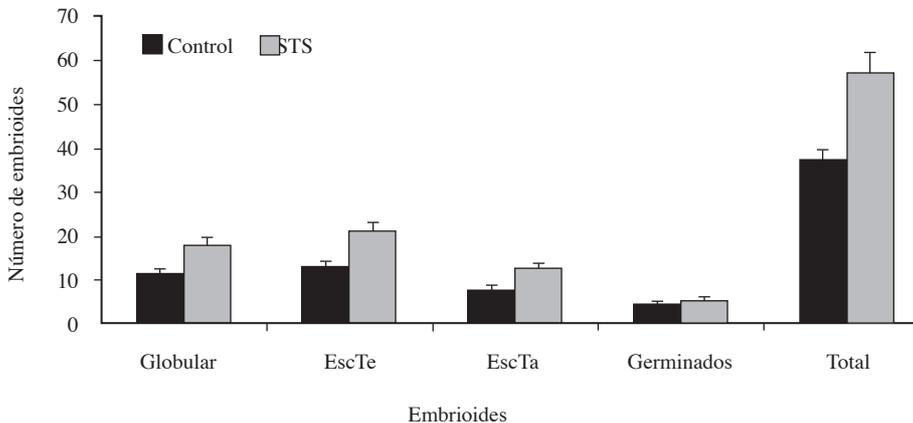


Fig. 2. Clasificación de los embriones somáticos producidos por 50 mg de callo, a los 14 días de cultivo, en medio de diferenciación en el tratamiento control y con STS. Las barras indican la desviación estándar.

de *Nicotiana plumbaginifolia* y *Triticum aestivum* (Purnhauser *et al.* 1987) e incrementaron la embriogénesis somática en *Daucus carota* (Roustan *et al.* 1989). El uso de inhibidores de la síntesis de etileno también promovió la diferenciación de brotes a partir de callos de *Brassica oleracea* (Sethi *et al.* 1990).

En los callos cultivados de caña de azúcar la presencia en el medio de cultivo del STS, inhibidor de la acción del etileno, favoreció la producción de embriones somáticos, lo que indica que para esta especie el etileno constituye un factor inhibitorio de la embriogénesis somática y que la reducción de esta hormona en el medio puede contribuir a incrementar la eficiencia en la formación de embrioides.

Por otra parte, se conoce que las poliaminas y el etileno tienen un intermediario común en su ruta metabólica, la metionina, precursor directo de la AdoMet (S-adenosilmetionina) que es el donador metil primario en las reacciones de transmetilación y participa en la biosíntesis de ambos, poliaminas y etileno (Onouchi *et al.* 2004). Los resultados de Nieves *et al.* (2005), Cid (2006) y Acevedo (2006), en callos de caña de azúcar, podrían relacionarse con el efecto de competencia en la ruta metabólica de ambas hormonas, debido a los incrementos en la producción de embriones somáticos con la aplicación de concentraciones bajas de putrescina (5 mmol l⁻¹) o inhibidores de la ruta a partir de la enzima S-adenosil metionina carboxilasa (MGBG

1 mmol l⁻¹). Un efecto contrario se observa al aplicar concentraciones superiores.

Si el STS a bajas concentraciones (7 μmol l⁻¹) favoreció la embriogénesis somática en este cultivo y dosis bajas de inhibidores de la ruta y de poliaminas también lo lograron, es indicativo que una reducción en la concentración de esta hormona puede favorecer el proceso embriogénico. Mientras que si la ruta de las poliaminas es bloqueada fuertemente y se favorece la del etileno, los resultados son negativos, lo que sugiere que tampoco es favorable una concentración alta de etileno para el proceso embriogénico en esta especie.

Las figuras 3 y 4 muestran el comportamiento de los embriones somáticos encapsulados en perlas de alginato de calcio, en presencia de STS en el medio de encapsulación.

Como se aprecia en la figura 3, la presencia de STS en el medio de endospermo tuvo un efecto adverso sobre la calidad de la germinación de los embriones somáticos encapsulados. En las cápsulas tratadas con STS un mayor porcentaje de embriones se necrosó, con diferencias significativas con el control y, aunque en este caso un mayor porcentaje de los mismos permaneció verde, solo una tercera parte del número total de ellos llegó a germinar.

En la figura 4 se observa que la presencia del STS en el medio no sólo afectó la germinación de los embriones somáticos, sino que también tuvo efecto sobre la calidad de las plantas, lo que pudo estar dado por la lentitud del proceso, ya

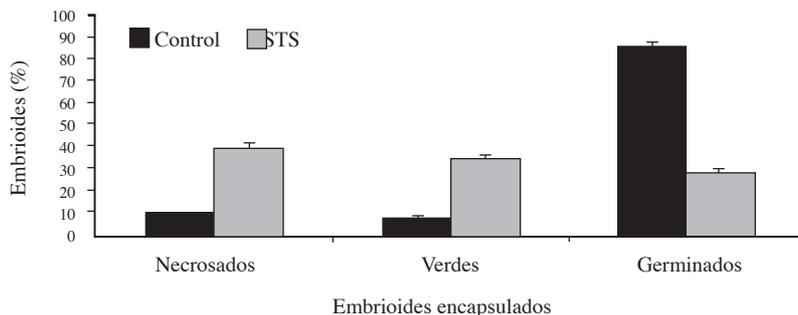


Fig. 3. Comportamiento de los embriones somáticos de caña de azúcar encapsulados en perlas de alginato de calcio. Las barras indican la desviación estándar.

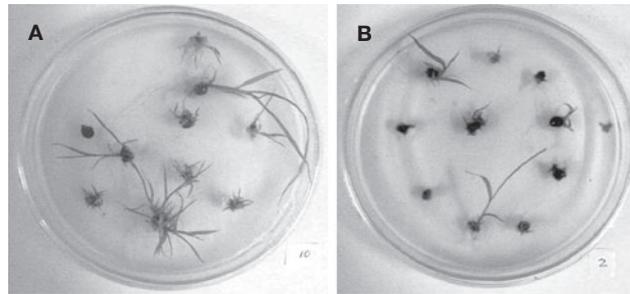


Fig. 4. Germinación de los embrioides encapsulados en perlas de alginato. A) control, B) STS en el medio.

que como se explicó anteriormente, los embrioides permanecieron verdes por largo tiempo y los que llegaron a germinar finalmente lo hicieron con una pobre calidad.

Protoplastos aislados a partir de suspensiones celulares de litchi, que se mantuvieron por cultivos alternativos en medio líquido y sólido, enriquecido con STS, fueron incapaces de dividirse de forma sostenida cuando se cultivaron en perlas de agarosa. Cuando el cultivo fue en perlas de alginato de calcio hubo división celular, formaron callos y posteriormente embriones somáticos. El 33,1% de los embriones regeneró a planta (Yu *et al.* 2000).

Según Yang y Hoffman (1984), el incremento en la producción de ACC sintasa endógena, ACC y etileno, en la presencia de AgNO_3 , es debido probablemente a un exceso de Ag en el medio, el cual puede ser fitotóxico, ya que la estimulación de la acumulación de etileno es una respuesta común de las plantas al estrés, lo cual se ha encontrado en hipocotilos de *Heliantus annuus* (Liu *et al.* 1990), y en flores cortadas de *Dianthus caryophyllus* (Veen y van de Geijn 1978). Sin embargo, Sethi *et al.* (1990) demostraron que el AgNO_3 redujo la emanación de etileno en callos de *B. oleraceae*. Esta discrepancia es debida, probablemente, a la tolerancia diferencial al Ag^+ en los diferentes cultivos o genotipos de plantas estudiados.

La concentración de STS evaluada, favoreció la producción de embriones somáticos a

partir de callos, pero inhibió la germinación de la semilla artificial. Al parecer la inhibición de la germinación de estos embrioides pudo ser afectada por algunas de las siguientes razones: i) los embriones somáticos encapsulados en el gel de alginato no soportaron la acumulación de iones plata, los cuales pudieron acumularse a niveles tóxicos para mantener inhibido el crecimiento de los mismos y no permitir su germinación, de ahí que permanecieran verdes por largo tiempo, pero finalmente no lograron emerger; ii) en el ambiente cerrado de la cápsula de alginato, el STS inhibió la acción del etileno y favoreció la de las poliaminas a niveles no permisibles para el desarrollo normal de los embrioides; iii) una disminución drástica del etileno por efecto del STS dentro de la matriz de alginato pudo también debilitar el embrión y reducir su capacidad para romper la semilla artificial y emerger de la misma.

LITERATURA CITADA

- ACEVEDO C.J. 2006. Efecto de las poliaminas exógenas y el MGBG (Metil glioxal bisguanilhidrazona) en la embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido). Trabajo de Diploma. UO.
- ATKINS S.W., SAMOSIR Y.M.S., NIKMATULLAH A., OGLE H. 2005. Coconut (*Cocos nucifera*) *in vitro* ecology: modifications of headspace and medium additives can optimize somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae* 54:303-315.

- BIDDINGTON N.L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 11(2): 173-187.
- CHO U.H., KASHA K.J. 1989. Ethylene production and embryogenesis from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant. Cell. Rep.* 8:415-417.
- CID M. 2006. Compuestos nitrogenados en la embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Tesis en opción al grado de Máster en Ciencias. UNICA.
- GERMANÁ M.A. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Citrus aurantium* and *Citrus reticulata*. *Biol Bratislava* 58(4): 843-850.
- GERMANÁ M.A. 2007. Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv Mandarino Tardivo di Ciaculli. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 88:117-120.
- GUIDERDONI E., MÉROT B., EKSOMTRAMAGE T., PAULET F., FELDMANN P., GLASZMANN J.C. 1995. Somatic embriogénesis. In: Sugarcane (*Saccharum*, Species). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 31 Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Y.P.S. Bajaj (ed). Springer- Berlin Heidelberg. p.92-113.
- HAYS D.B., REID D.M., YEUNG D.C., PHARIS R.P. 2000. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany* 51(352): 1851-1859.
- HEINZ D.J., OSGOOD R.V. 1994. Sugarcane. *Encyclopaedia of Agricultural Science*, Vol. 4. Academic, Inc. p. 225-238.
- HUXTER T.J., THORPE T.A., REID D.M. 1981. Shoot initiation in light- and dark-grown tobacco callus: the role of ethylene. *Physiologia Plantarum* 53:319-326.
- IPEKCI Z., GOUZUKIRIMIZI N. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep.* 2(1): 16-24.
- IRVINE J.E. 1999. *Saccharum* species as horticultural classes. *Theor. Appl Genet.* 98:186-194.
- LAKSHMANAN P., GEIJSKES R., AITKEN K.S., GROF C.L.P., BONNETT G.D., SMITH G.R. 2005. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 41:345-363.
- LIEBERMAN M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Plant. Physiol.* 30:533-591.
- LIU J., MUKHERJEE I., REID D.M. 1990. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. III. The role of ethylene. *Physiologia Plantarum* 78:268-276.
- MATTOO P.D., JEFFREY C., SUTTLE D. 1991. The plant hormone ethylene 5^a ed.
- MCQUALTER R.B., FONG B., CHONG M., O'SHEA K., MEYER VAN DYK D.E., VIITANEN P.V., BRUMBLEY S.M. 2004. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. *Plant Biotechnol. J.* 2:1-13.
- MORGAN P.W., DREW M.C. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100 (3): 620-630.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NIEVES N., LORENZO J.C., BLANCO M.A., GONZÁLEZ J.L., PERALTA H., HERNÁNDEZ M., SANTOS R., CONCEPCIÓN O., BORROTO E., BORROTO C.G., TAPIA R., MARTÍNEZ M., FUNDORA Z. 1998. Artificial endosperm by zygotic embryos of cleopatra tangerine (*Citrus reshni* Hort Ex Tan). A model by somatic embryos encapsulation. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 52 (2): 77-78.
- NIEVES N., CID M., GONZÁLEZ R., SAGARRA F., LEZCANO Y., BLANCO M., CASTILLO R. 2005. Los compuestos nitrogenados en la embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Saccharum* spp). *Boletín Elect. Jornada Cient. INIFAT*.
- NISSEN P. 1994. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiologia Plantarum* 92:397-401.
- NONATO R.V., MANTELATTO P.E., ROSSELL C.E.V. 2001. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:1-5.
- ONOUCI H., LAMBEIN I., SAKURAI R., SUZUKI A., CHIBA Y., NAITO S. 2004. Autoregulation of the gene for cystathionine γ -synthase in Arabidopsis: post-transcriptional regulation induced by S-adenosylmethionine. *Biochemical Society Transactions* 32:597-600.

- PATERSON-ROBINSON K.E., ADAMS D.O. 1987. The role of ethylene in the regeneration of *Helianthus annuus* (sunflower) plants from callus. *Physiologia Plantarum* 71:151-156.
- PURNHAUSER L., MEDGYESY M., CZEKO P.J., MARTON L. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.* 6:1-4.
- ROUSTAN J.P., LATCHE A., FALLOT J. 1989. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.* 8:182-185.
- SETHI U., BASU A., GUHA-MUKHERJEE S. 1990. Control of cell proliferation and differentiation by modulators of ethylene biosynthesis and action in *Brassica hypocotyl* explants. *Plant Sci.* 69:225-229.
- SMULDERS M.J.M., KEMP A., BARENDSE G.W.M., CROES A.F., WULLEMS G.J. 1990. Role of ethylene in auxin-induced flower bud formation in tobacco explants. *Physiologia Plantarum* 78:67-172.
- TAPIA R., CASTILLO R., NIEVES N., BLANCO M.A., GONZÁLEZ J.L., SÁNCHEZ M., RODRÍGUEZ Y. 1999. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) Var. Cp52-43. *Biotecnología Aplicada* 16(1): 20-231.
- TORNÉ J.M., RODRÍGUEZ P., MANICH A., CLAPAROLS I., SANTOS M.A. 1997. Embryogenesis induction in petals of *Araujia sericifera*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 51(2): 95-102.
- VEEN H., VAN DE GEIJN S.C. 1978. Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations. *Planta* 140:93-96.
- WORLD SUGAR STATISTICS. FAO 2005. Lights, Agra Informa Limited, Kent, UK.
- YANG S.F., HOFFMAN N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.
- YUC., CHEN Z., LUL., LIN J. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplasts isolated from embryogenic suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61(1): 51-58.
- ZHANG G.Q., ZHANG D.Q., TNAG GX., HE Y., ZHOU WJ. 2006. Plant development from microspore-derived embryos in oil rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Physiologia Plantarum* 50:180-186.