

Determinación del contenido de los principales componentes del medio de cultivo durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722

Manuel de Feria*, Elio Jiménez, Raúl Barbón, Alina Capote, Maité Chávez, Elisa Quiala *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: mdeferia@ibp.co.cu

RESUMEN

El agotamiento de los componentes del medio de cultivo y su posible influencia en el desarrollo *in vitro* de las plantas, ha sido un tema poco estudiado. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de conocer y determinar en la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, el contenido de los principales componentes del medio de cultivo durante 56 días de cultivo. Para ello, cada siete días, se tomaron muestras de 30 ml, tanto del medio de cultivo fresco como del renovado y se determinó el contenido de azúcares, 6-BAP y de los principales iones. Se observó cómo durante los primeros 21 días de cultivo y debido a la hidrólisis de la sacarosa, se detectaron sus dos monosacáridos constituyentes (glucosa y fructosa), los cuales se agotaron completamente a los 56 días de cultivo. En el caso del 6-BAP, su contenido en el medio de cultivo disminuyó rápidamente durante los primeros 21 días y a pesar de adicionarse cada siete días una concentración similar a 2.75 mg.l^{-1} , no fue detectado en las muestras analizadas a partir de los 28 días de cultivo. Al determinar el contenido de diferentes iones, se concluyó que elementos como el magnesio y cloruro disminuyeron poco en el medio de cultivo, contrario a lo ocurrido con el fosfato, potasio, calcio y sulfato. Al analizar el contenido de iones como el amonio y nitrato, y su relación con las variaciones del pH, se observó que durante los primeros 21 días de cultivo se produjo un mayor agotamiento de nitrógeno en forma de amonio y un rápido descenso del pH. Sin embargo, a partir de los 21 días de cultivo se observaron los primeros embriones somáticos en etapa globular y ese momento coincidió con el inicio de un incremento gradual de los valores de pH y con el inicio también del agotamiento de nitrógeno en forma de nitrato.

Palabras clave: café, iones, sacarosa, 6-BAP

ABSTRACT

Exhaustion of culture medium components and possible influence on the *in vitro* development of plants has been little studied. The current work was developed in order to know and determine contents of the main components in culture medium in the differentiation stage of cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, during 56 days of culture. Samples of 30 ml were taken every seven days, even from fresh culture medium than the renovated one. Then, content of sugars, 6-BAP and main ions were determined. During the first 21 days of culture and due to the hydrolysis of the sucrose, the two monosaccharide constituents (glucose and fructose) were present. These were completely exhausted at 56 days of culture. Content of 6-BAP in the culture medium diminished quickly during the first 21 days. Although a concentration of 2.75 mg.l^{-1} was added every seven days, it was not detected in the samples analyzed after 28 days of culture. Content of different ions was determined. Elements such as magnesium and chloride decreased slightly in the culture medium. Contrary happened to phosphate, potassium, calcium and sulphate. Content of ions such as ammonium and nitrate were analyzed and their relationship with the variations of pH too. During the first 21 days of culture there was a further depletion of nitrogen in ammonia form and a rapid decrease in pH. However, after 21 days of culture the first somatic embryos in globular stage were observed. This moment coincided with the beginning of a gradual increment of pH values and also the beginning of nitrogen depletion in nitrate form.

Keywords: coffee, ions, sucrose, 6-BAP

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo para la regeneración de plantas *in vitro* en su concepción amplia puede

estar constituido por la combinación de nutrientes y agua. Regularmente, además de los nutrientes inorgánicos, un medio de cultivo puede estar compuesto por carbohidratos,

vitaminas e incluso aminoácidos (George y de Klerk, 2008). Con frecuencia a la combinación de estos compuestos se le ha denominado medio de cultivo basal, al que puede incorporarse algún regulador del crecimiento.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin agua y nutrientes minerales no habría desarrollo de plantas *in vitro*. Sin embargo, para el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos es necesario, además, adicionar una fuente de carbono. La sacarosa es la más comúnmente empleada, pues reemplaza al carbono que normalmente las plantas fijan desde la atmósfera al realizar fotosíntesis (George y de Klerk, 2008) y esto es necesario debido a que el crecimiento *in vitro* regularmente tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en la oscuridad.

La composición de un medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* varía con la especie, e incluso es específica de acuerdo con la parte de la planta que se quiera cultivar o a la respuesta que se desee obtener (Ramage y Williams, 2002). Los reguladores del crecimiento como las citoquininas se incorporan al medio de cultivo para estimular la división celular y controlar el proceso de morfogénesis, pues favorecen la formación de yemas axilares por la ruptura de la dominancia apical (van Staden *et al.*, 2008). Una de las citoquininas más empleada en el cultivo *in vitro* es 6-Bencilaminopurina (6-BAP).

Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones de medios de cultivo. Sin embargo, el propuesto por Murashige y Skoog (1962), conocido mundialmente como (MS) ha sido el más empleado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas. Esto se debe a las elevadas concentraciones de casi todos sus componentes, los cuales casi nunca han sido declarados como limitantes para la regeneración de plantas *in vitro*.

No obstante, varios han sido los resultados descritos al modificar diferentes formulaciones de medios de cultivo en función de mejorar la respuesta de las plantas

in vitro (Pullman *et al.* 2003; Nas y Read, 2004; Bouman y Tiekstra, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005). Como se conoce, los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Por ejemplo: el magnesio es parte de la molécula de clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el hierro, zinc y molibdeno son parte de ciertas enzimas. Además del carbono, oxígeno e hidrógeno se conocen otros 14 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, iones de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, azufre, hierro, níquel, cloro, manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno. Los seis primeros se requieren en mayores concentraciones y se les conoce como macronutrientes, los ocho últimos son demandados en concentraciones más bajas y se les denomina micronutrientes (George y de Klerk, 2008).

Muchas publicaciones científicas describen resultados generales relacionados con la regeneración de plantas tanto por organogénesis como por embriogénesis somática. En el caso específico relacionado con la formación y producción de embriones somáticos, son pocos los trabajos que mencionan o abordan temas relacionados con la asimilación de los componentes del medio de cultivo y la respuesta de este tipo de material vegetal en función de la composición del medio de cultivo. La regeneración de plantas por embriogénesis somática ha sido considerada como un método eficiente. Sin embargo, sino se conoce con mayor precisión qué ocurre durante el desarrollo de este proceso, sería difícil llegar a disponer de protocolos verdaderamente eficientes para su aplicación a escala productiva.

Por todo lo argumentado anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar en diferentes tiempos durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, el contenido de azúcares, 6-BAP y de diferentes cationes y aniones presentes en el medio de cultivo. Esta información contribuirá a la comprensión de los eventos morfogénicos que ocurren desde que una célula da lugar a un embrión somático y este

adquiere un desarrollo tal que le permite germinar y convertirse en planta, hasta para la posible optimización de estos procesos a la hora de realizar producciones a mayor escala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó como inóculo una suspensión celular en fase de multiplicación en su etapa exponencial (nueve días de cultivo) según la metodología descrita por de Feria *et al.* (2000). Se emplearon cinco Erlenmeyers de 300 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo por frasco, a los cuales se les renovó el 55.0% del medio de cultivo con una frecuencia de siete días según la metodología descrita por de Feria *et al.* (2000).

Medio de cultivo

Se empleó el compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962), 1.0 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg.l⁻¹ de piridoxina, 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 0.01 mg.l⁻¹ de biotina, 1.0 mg.l⁻¹ de pantotenato de calcio, 5.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 40 mg.l⁻¹ de adenina, 400 mg.l⁻¹ de extracto de malta, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y pH 5.8.

Determinación del contenido de nutrientes en el medio de cultivo

Desde el inicio de la fase de diferenciación y hasta los 56 días de cultivo, al renovar cada siete días el medio de cultivo, se tomaron nueve muestras de 30 ml, tanto del medio de cultivo fresco como del medio de cultivo renovado. Las muestras se centrifugaron a 10 000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se congeló en nitrógeno líquido y se conservó mantenido a -20°C hasta que concluyó el experimento y estuvieron colectadas todas las muestras para su análisis.

A cada muestra de medio de cultivo se le determinó el contenido de azúcares, 6-BAP, aniones y cationes. Excepto las determinaciones de azúcares, las restantes fueron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Para cada evaluación, se tomaron cinco muestras, es decir, una por cada réplica y los resultados que se presentan en cada

evaluación están referidos al valor medio de las cinco muestras.

Determinación de azúcares

Se empleó un kit enzimático (Sacarosa/Glucosa/Fructosa) (Boehringer Mannheim) y se siguió la metodología descrita por Bermeyer y Bernt (1974). El resultado se expresó en g.l⁻¹.

Determinación de 6-BAP

Se utilizó una columna de fase reversa desactivada para bases del tipo SUPELCOSIL LC-18-DB. La fase móvil fue acetonitrilo/1.0% ácido acético/1.0 mM de fosfato tetrabutil de amonio en agua a pH 2.8, el flujo fue de 2.0 ml.min⁻¹, a 35°C, la detección se realizó a los 280 nm y el resultado de cada análisis se expresó en mg.l⁻¹.

Determinación de aniones y cationes

Se determinó la presencia de nitrato (NO₃⁻), fosfato (PO₄³⁻), sulfato (SO₄²⁻) y cloruro (Cl⁻). La columna empleada fue de fase reversa del tipo Asahipak ODP-50, con una fase móvil compuesta por agua/acetonitrilo en una proporción de 86/14% más un modificador. El pH fue ajustado a 8.6 con hidróxido de sodio (NaOH) libre de carbonato, el flujo de 1.5 ml min⁻¹, a 40°C, la detección se realizó a 266 nm y los resultados se expresaron en mg.l⁻¹.

Además, se realizaron determinaciones de amonio (NH₄⁺), potasio (K⁺), magnesio (Mg²⁺) y calcio (Ca²⁺). En este caso se utilizó una columna de intercambio iónico del tipo Waters IC-Pack C M/D, con una fase móvil de 0.1 mM EDTA/3.0 mM de ácido nítrico, un flujo de 1.0 ml min⁻¹ y se inyectaron 100 µl para realizar finalmente la detección por conductividad y expresar el resultado en mg.l⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de azúcares

Durante los primeros 21 días de cultivo y debido probablemente a la hidrólisis de la sacarosa por la acción del proceso de esterilización, se detectó en el medio de cultivo la presencia de sus dos monosacáridos constituyentes (glucosa y fructosa) (Figura 1).

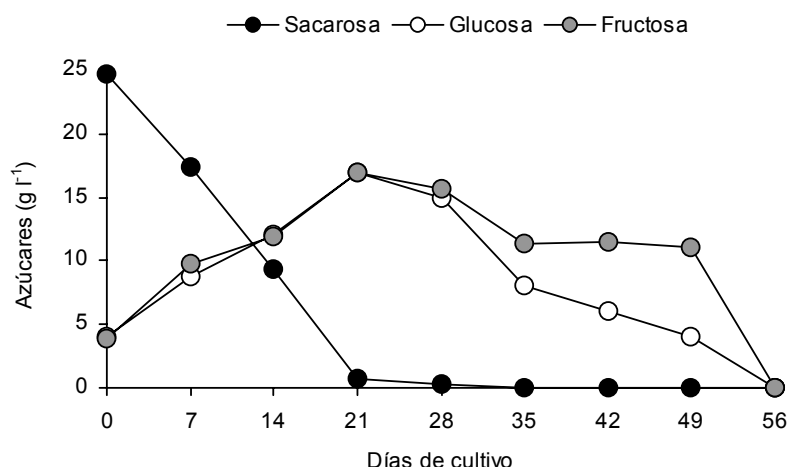


Figura 1. Contenido de azúcares (g.l⁻¹) en el medio de cultivo al desarrollar durante 56 días de cultivo la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

Fue a partir de los 28 días de cultivo, que se observó una mayor disminución en el contenido de glucosa con respecto a la fructosa. Estos resultados demostraron que es necesario prestar mayor atención al contenido de estos compuestos en el medio de cultivo, pues su agotamiento pudiera afectar el proceso de histodiferenciación.

Autores como Tubbe y Buckhout (1992), explicaron que este desbalance en la asimilación de una u otra hexosa, se debe a la mayor afinidad que presentan los transportes específicos de hexosas por la glucosa.

Los resultados del presente estudio coinciden con los obtenidos por Botha y O'Kennedy (1998) al evaluar el consumo de glucosa y fructosa en suspensiones celulares de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol), pues en sus resultados estos autores describen cómo la glucosa también fue más rápidamente asimilada por el cultivo que la fructosa. Estos autores explicaron que la principal diferencia entre las propiedades cinéticas para la asimilación de estas hexosas, se debe a que la presencia de glucosa en el medio de cultivo constituye un fuerte inhibidor para la asimilación de la fructosa.

Ambos análisis pudieran formar parte de las explicaciones a los resultados del presente estudio en relación con la asimilación de ambas fuentes de carbono, las cuales, parecen convertirse en compuestos deficitarios del proceso de diferenciación durante los últimos

siete días de cultivo, pues a los 56 días de cultivo no había presencia de azúcares detectables en el medio de cultivo.

Determinación de 6-BAP

En cuanto al contenido 6-BAP, en la figura 2 se observa que este compuesto disminuyó su concentración inicial (5.0 mg.l⁻¹) durante los primeros 21 días de cultivo. A pesar de adicionarse cada siete días una concentración equivalente a 2.75 mg.l⁻¹ en el volumen de medio de cultivo renovado (55 ml), no se detectó en las muestras analizadas la presencia de 6-BAP a partir de los 28 días de cultivo. Esto evidencia que la concentración adicionada en cada renovación del medio de cultivo, se agotó totalmente durante los siguientes siete días de cultivo.

Se conoce el papel de las citoquininas para alcanzar la maduración de los embriones somáticos y que no todas actúan de igual manera para un mismo proceso y en un mismo medio de cultivo.

Según Fujimura y Komamine (1975), existe especificidad entre el tipo de regulador del crecimiento y el cultivo. Por ejemplo en *Daucus carota* (zanahoria), la zeatina favorece los procesos embriogénicos, mientras que el 6-BAP y la kinetina los inhiben. En *Coffea* spp. (cafeto), Yasuda *et al.* (1985) y de Feria *et al.* (2003) hacen mención a los buenos resultados logrados en la formación y desarrollo de los embriones somáticos con el empleo de 6-BAP.

Estos resultados abren la interrogante de si se convierte realmente en un compuesto deficitario y necesario para mejorar la respuesta del cultivo en esta fase del proceso embriogénico o si es suficiente con el efecto inducido al inicio de este proceso y quizás mantenido luego con la concentración incorporada al renovar el 55% del medio de cultivo cada siete días.

Determinación de cationes y aniones

Al determinar el contenido en el medio de cultivo de diferentes iones, se pudo definir que

elementos como el magnesio (Mg^{2+}) y el cloruro (Cl^-) variaron poco respecto a sus concentraciones iniciales, contrario a lo ocurrido con el fosfato (PO_4^{3-}), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y sulfato (SO_4^{2-}), que sus contenidos disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de cultivo. Precisamente, el fosfato y el potasio fueron dos de los compuestos que se agotaron con mayor rapidez por el cultivo y que no parecen limitar la formación y diferenciación de los embriones somáticos, pues a los 56 días de cultivo, aun estaban presentes en el medio de cultivo (Figuras 3 y 4).

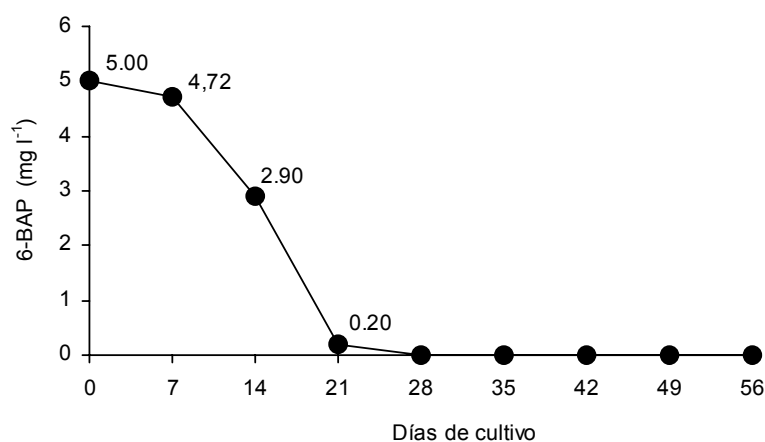


Figura 2 Contenido de 6-BAP ($mg.l^{-1}$) en el medio de cultivo, durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

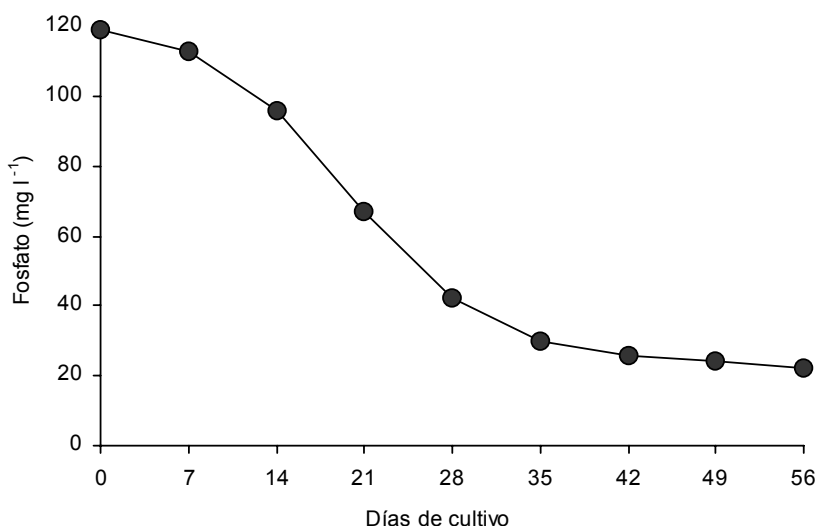


Figura 3. Contenido de fosfato ($mg.l^{-1}$) en el medio de cultivo, durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

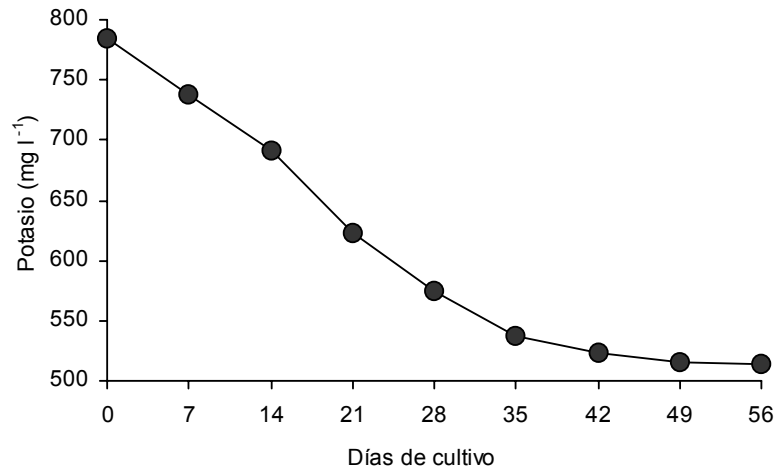


Figura 4. Contenido de potasio (mg.l⁻¹) en el medio de cultivo durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

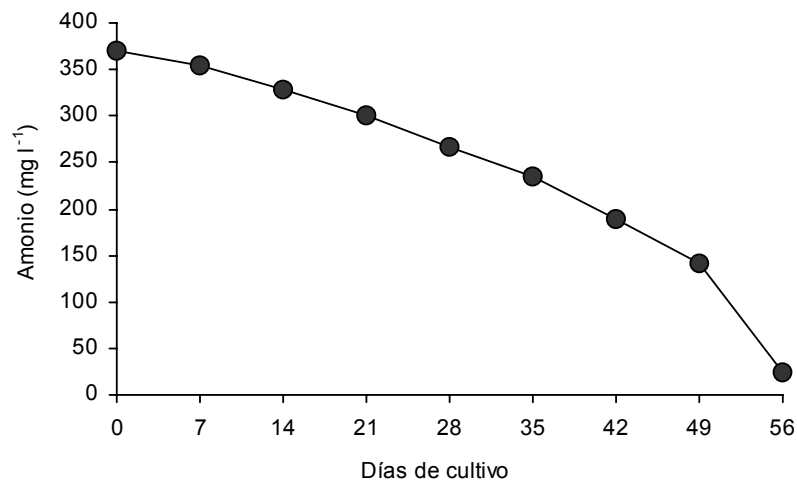


Figura 5. Contenido de amonio (mg.l⁻¹) en el medio de cultivo, durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

Autores como Curtis *et al.* (1991) y Van Gulik *et al.* (1993), al trabajar con suspensiones celulares de *Papaver somniferum* L. (opio) y *Catharanthus roseus* G. Don. (vicaria), respectivamente ratificaron que precisamente el fosfato es uno de los elementos que más rápido se asimila y que se almacena intracelularmente en concentraciones considerables.

Por su parte, investigadores como Wen y Zhong (1997), lograron correlacionar la asimilación de fosfato con el crecimiento específico de las células, al analizar los cambios que se producen entre el fosfato extra e intracelular.

Esto les permitió además, evaluar los efectos de la concentración inicial de fosfato sobre diferentes aspectos fisiológicos en suspensiones celulares de *Oryza sativa* (arroz) y correlacionarlo también con el consumo de nitrógeno y azúcares.

Al analizar el contenido de iones como el amonio (NH₄⁺) y el nitrato (NO₃⁻) y su relación con las variaciones del pH, se pudo observar que durante los primeros 21 días de cultivo se produjo un mayor agotamiento de nitrógeno en forma de amonio (Figura 5) y simultáneamente coincidió con este período que el pH manifestó un rápido descenso desde 5.13 hasta 4.08 (Figura 6).

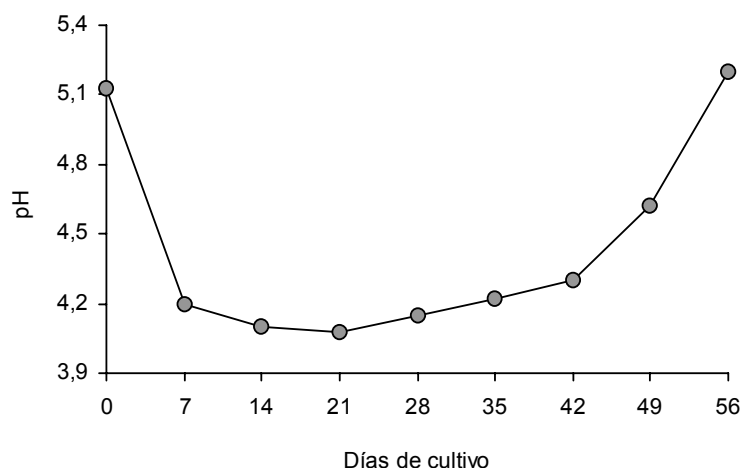


Figura 6. Variaciones del pH durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

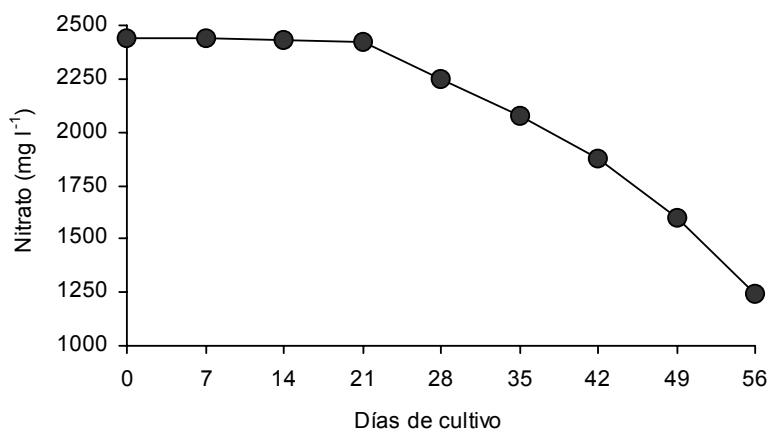


Figura 7. Contenido de nitrato (mg.l⁻¹) en el medio de cultivo, durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

Según George y Klerk (2008), en un medio de cultivo enriquecido con nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), con pH inicial ajustado entre 5.4 y 5.8, los cultivos tienen preferencia por el nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) y su asimilación implica la liberación al medio de cultivo de hidrógeno (H^+) lo que provoca una disminución en los valores de pH.

Esta condición (la acidez del medio de cultivo) favorece la absorción del nitrógeno en forma de nitrato, dando como resultado la formación de grupos hidroxilos (OH^-) en el medio de cultivo y en consecuencia un gradual incremento en los valores del pH (George y Klerk, 2008). Similar respuesta se observó durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 cuando a partir

de los 28 días de cultivo se observó un incremento gradual del pH, después de haber presentado el valor más bajo a los 21 días de cultivo.

Fue precisamente a partir de los 21 días de cultivo que se observó la aparición de los primeros embriones somáticos en etapa globular, evento que coincidió con el inicio de un incremento gradual de los valores de pH en el medio de cultivo y con el inicio también de una mayor asimilación de nitrógeno en forma de nitrato (Figura 7).

Esta relación entre el tiempo de aparición de los embriones somáticos y el inicio de un incremento gradual en los valores de pH, puede explicarse por el balance nitrato-amonio en el medio de cultivo.

Diferentes autores han demostrado que en dependencia del cultivo con que se trabaje, cuando este balance favorece al nitrato en determinada proporción, entonces se inicia la formación de embriones somáticos en etapa globular (Grimes y Hodges, 1990).

En el caso de las suspensiones celulares de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, la relación nitrato-amonio en mg.l⁻¹ a los 21 días de cultivo cuando se observaron los primeros embriones somáticos fue de 8:1. Ambas fuentes de nitrógeno tampoco parecen limitar el proceso de formación de los embriones somáticos al no agotarse completamente en el medio de cultivo, a pesar de que fueron las que en mayor proporción disminuyeron durante la fase de diferenciación de las suspensiones celulares de café, con respecto a sus concentraciones iniciales, resultado que coincidió con otros estudios similares expresados por George y Klerk (2008).

Este tipo de estudio, permitirá determinar los verdaderos requerimientos nutricionales de los cultivos desarrollados *in vitro*, con particular importancia para la regeneración de plantas por embriogénesis somática. También permitirá diseñar estrategias donde solo se adicionen los elementos que estén deficitarios en cada momento del proceso siempre y cuando se demuestre su importancia, sustituyendo así la práctica común de realizar la renovación parcial o total del medio de cultivo por simple ensayo y error.

Estos resultados abren nuevas interrogantes y constituyen además la base para desarrollar posibles nuevas formulaciones de los medios de cultivos, de forma tal que se adapten a las necesidades nutricionales de cada especie vegetal según el proceso morfogénico que tenga lugar y por lo tanto, se logre una mejor utilización de estos elementos a la hora de realizar procesos a mayor escala.

CONCLUSIONES

Se demostró cuán importante resulta determinar el contenido de azúcares, 6-BAP aniones y cationes en el medio de cultivo. Evaluar cómo se produjo el agotamiento de la sacarosa y sus dos monosacáridos constituyentes, permitió entender el proceso y valorar mejor la importancia de estas diferentes fuentes de carbono.

Compuestos como el 6-BAP, una citoquinina empleada regularmente en la fase de formación y diferenciación de embriones somáticos de muchas especies, no fue detectada en el medio de cultivo a partir de los 28 días de cultivo y abrió nuevas interrogantes sobre su utilización e incidencia durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares de café.

Sin embargo, determinar el contenido de los principales iones del medio de cultivo, puso en evidencia que resulta importante conocer sobre este particular y comprobar una vez más que los elementos inorgánicos que componen el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) no se agotaron y pudiera ser un medio de cultivo modificado y reformulado en función de la fase del cultivo *in vitro* a desarrollar, en particular cuando se realicen procesos *in vitro* relacionados con la embriogénesis somática.

REFERENCIAS

- Bergmeyer, HU, Bernt E (1974) Sucrose. En: Bergmeyer HU (Ed) Methods of Enzymatic Analysis, pp. 1176-1179. Academic Press, New York
- Botha, FC, O'Kennedy MM (1998) Carbohydrate utilisation by cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. Physiology Plantarum 102: 429-436
- Bouman, H, Tiekstra A (2005) Adaptations of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 493-505. Springer, Dordrecht
- Curtis, WR, Hasegawa PM, Emery AH (1991) Modeling linear and variable growth in phosphate limited suspension cultures of opium poppy. Biotechnology and Bioengineering 38: 371-379
- de Fera, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2000) Multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. Biotecnología Vegetal 1: 13-20
- de Fera, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 1-6
- Fujimura, T, Komamine A (1975) Effects of various growth regulators on the embryogenesis in carrot cell suspension culture. Plant Science Letters 5: 359-364

- George, EF, de Klerk GJ (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro and Micro-Nutrients. En: George EF Hall M y de Klerk GJ (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, pp. 65-113. Springer, Dordrecht
- Gonçalves, S, Correia PJ Martins-Loução MA, Romano A (2005) A new medium formulation for *in vitro* rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentration. Biology Plant 49: 277-280
- Grimes, HD, Hodges TK (1990) The inorganic NO_3^- : NH_4^+ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oriza sativa* L.). Journal Plant Physiology 136: 362-367
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497
- Nas, MN, Read PE (2004) A hypothesis for the development of a defined medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Science Hortic. 101: 189-200
- Pullman, GS, Montello P, Cairney J, Xu N, Feng X (2003) Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. Plant Science 164: 955-969
- Ramage, CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro* Cell Development Biology Plant 33: 116-124
- Tubbe, A, Buckhout TJ (1992) *In vitro* analysis of the H^+ -hexose symporter on the plasma membrane of sugar-beets (*Beta vulgaris* L.). Plant Physiology 99: 945-951
- Van, Gulik, WM ten, Hoopen HJG, Heijnen JJ (1993) A structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspensions in batch and chemostat culture. Biotechnol Bioeng 41: 771-780.
- Van Staden, J, Zazimalova E, George EF (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: George EF Hall M y de Klerk GJ (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, pp. 205-226. Springer, Dordrecht
- Wen, ZY, Zhong JJ (1997) Effects of initial phosphate concentration on physiological aspects of suspension cultures of rice cells: a kinetic study. Journal of Fermentation and Bioengineering 83: 381-385
- Yasuda, T, Fujii Y, Yamaguchi T (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiology 3: 595-597