Biotecnología Vegetal Vol. 12, No. 1: 33 - *40, enero - marzo, 2012*
ISSN 1609-1841 (Versión impresa)
ISSN 2074-8647 (Versión electrónica)

Análisis del contenido de nutrientes minerales durante la formación y maduración de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa* AAAB)

L. García-Águila[1]*, Y. Alvarado-Capó[1], R. G. Kosky[1], Z. Sarría[1], B. Chong-Pérez[1], M. Reyes[1], B. Pérez[1], A. Concepción[1], A. Mollineda[2] *Autor para correspondencia.

[1]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.

[2]Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830.

RESUMEN

A pesar de los avances que ha tenido la embriogénesis somática en *Musa* spp. no existen estudios que reflejen los requerimientos de nutrientes minerales durante su desarrollo. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo al inicio y final de las fases de formación y maduración de embriones somáticos de 'FHIA-21' cultivados con dos densidades de inoculación. Para la formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido se utilizaron dos densidades de inoculación (0.5 y 1.5 gMF) de agregados celulares embriogénicos. A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados. Posteriormente, estos se colocaron en medio de cultivo líquido de maduración y se utilizaron 0.2 y 0.6 gMF de densidad de inoculación. A los 30 días de cultivo se observaron las características morfológicas de los embriones somáticos y se transfirieron a medio de cultivo semisólido de germinación. El número de embriones somáticos germinados se cuantificó a los 30 días de cultivo. En ambas fases se determinó el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio, Hierro, Cobre, Manganeso y Zinc en el medio de cultivo por espectroscopia de absorción atómica. Los resultados mostraron el efecto regulatorio de la densidad de inoculación sobre la formación y desarrollo ontogénico de embriones somáticos en 'FHIA-21'. No se comprobó una relación entre el factor densidad de inoculación y el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo. La formación de un mayor número de embriones somáticos se correspondió con una reducción en el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio y Zinc. Se evidenció la importancia del hierro en la fase de maduración.

Palabras clave: embriogénesis somática, hierro, regeneración de plantas

ABSTRACT

Despite the advances reached using somatic embryogenesis in *Musa* spp., there are not studies that state the requirements of mineral nutrient during its development. This investigation aimed to determine the mineral nutrient content in the culture medium at the beginning and end of the 'FHIA-21' somatic embryos formation and maturation phases. Two inoculation densities (0.5 and 1.5 gMF) of embryogenic cell aggregates were used for the somatic embryos formation in liquid culture medium. The number of somatic embryos formed was quantified after 30 days of culture. The content of Calcium, Magnesium, Potassium, Iron, Copper, Manganese and Zinc in the culture medium was determined by automatic absorption spectroscopy in both phases. Results showed the regulatory effect of inoculation density on the ontogenic formation and development of somatic embryos of 'FHIA-21'. No relation between the inoculation density factor and mineral nutrients content was observed. The formation of a higher number of somatic embryos corresponded to a reduction in the content of Calcium, Magnesium, Potassium and Zinc. The importance of Iron in the maturation phase was evident.

Key words: somatic embryogenesis, iron, plant regeneration

INTRODUCCIÓN

El éxito del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales está influenciado por los componentes del medio de cultivo (Ramage y Williams, 2002). Entre estos, los nutrientes minerales son los de mayor importancia porque intervienen en las funciones celulares y en el metabolismo de las

plantas (George y de Klerk, 2008). Por esta razón constituyen la mejor variable para estudiar su efecto sobre la respuesta morfogenética de los tejidos vegetales (Kothari-Chajer *et al*., 2008), dada por la formación de órganos o embriones somáticos.

En el género *Musa*, el desarrollo de la embriogénesis somática ha tenido dos objetivos principales: disponer de una técnica con alta eficiencia para la micropropagación y de un sistema de regeneración a nivel celular útil para la transformación genética e hibridación somática (Georget *et al*., 2000). Al respecto, investigaciones anteriores han demostrado la importancia de la densidad de inoculación en la formación y desarrollo de embriones somáticos, en este género (Barranco *et al*., 2009).

El efecto de la densidad de inoculación puede estar relacionado con la disponibilidad de nutrientes minerales en el medio de cultivo. El papel de estos en el desarrollo de los cultivos embriogénicos ha sido citado por varios autores en diferentes especies (Takeda *et al*., 2003; Kintzios *et al*., 2004; Desai *et al*., 2006; Mahalakshmi *et al*., 2007; Minyaka *et al*., 2008; De Feria *et al*., 2009; Saha *et al*., 2010). Sin embargo, a pesar de los avances que ha tenido la embriogénesis somática en *Musa* spp. no existen estudios que reflejen los requerimientos de nutrientes minerales durante el desarrollo de este proceso morfogenético. Es por ello, que los estudios relacionados con el análisis del contenido de elementos minerales en el medio de cultivo podrían contribuir a dilucidar el efecto de la densidad de inoculación, además de proporcionar información que puede ser utilizada en la formulación de los medios de cultivo durante el desarrollo de la embriogénesis somática en este género. En este sentido, Adelberg *et al*. (2010) consideraron que el análisis del contenido residual del medio de cultivo era una herramienta importante para determinar la influencia de los elementos minerales en la respuesta de diferentes especies al cultivo de tejidos.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, este trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo al inicio y final de las fases de formación y maduración de embriones somáticos de 'FHIA-21' cultivados con dos densidades de inoculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron en campo brotes florales masculinos de plantas adultas del cultivar de plátano 'FHIA-21'. Los brotes se colectaron después de emitida la última flor femenina y se trasladaron al laboratorio para su desinfección y posterior extracción de flores masculinas inmaduras.

Inducción de callos con estructuras embriogénicas y establecimiento de suspensiones celulares

La inducción de callos con estructuras embriogénicas se promovió a partir de las flores masculinas inmaduras, siguiendo el procedimiento descrito por Escalant *et al*. (1994) para el cultivar de banano 'Grande Naine'. Estos callos fueron utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (SCE), las cuales seiniciaron con 150 mg de masa fresca (MF) de estructuras embriogénicas en Erlenmeyers (25 ml de volumen total) que contenían 3.0 ml del medio de cultivo líquido. A los 30 días de cultivo, las SCE fueron tamizadas con filtros de malla metálica de 0.5 mm de longitud de poro y su multiplicación se efectuó con la adición de 1.0 ml de agregados celulares sedimentados en Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo (Daniels *et al*., 2002). Después de cinco subcultivos cada 30 días, se utilizaron las SCE para la formación de embriones somáticos a partir de los agregados celulares embriogénicos.

Formación de embriones somáticos

Para la formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido se utilizaron dos densidades de inoculación (0.5 y 1.5 gMF) de agregados celulares embriogénicos. Estas se adicionaron en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad, que contenían 30 ml de medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales inorgánicas SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), 0.5 mg l^{-1} de biotina, 100 mg l^{-1} de extracto de malta, 100 mg l^{-1} de L-glutamina, 230 mg l^{-1} de L-prolina, 10 mg l^{-1} de lactosa, 0.05 mg l^{-1} de

zeatina, 100 mg l^{-1} de mio-inositol, 0.2 mg l^{-1} de ácido naftaleno acético, 0.2 mg l^{-1} de isopenilaminopurina, 0.1 mg l^{-1} de Kinetina y 45 g.l^{-1} de sacarosa. El pH se ajustó a 5.3 antes de la esterilización por autoclave.

A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos y los datos se procesaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. La comparación de las medias se efectuó mediante la prueba de Dunnett C con un nivel de significación del 95.0%. Se empleó el paquete estadístico *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versión PASW Statistic 18.

Maduración y germinación de embriones somáticos

Los embriones somáticos que se formaron se colocaron en medio de cultivo líquido de maduración. En esta fase se utilizaron 0.2 y 0.6 gMF de densidad de inoculación, en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad que contenían 30 ml del medio de cultivo propuesto por Kosky *et al*. (2000). Este medio de cultivo contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas MS al 100%, 1.0 mg l^{-1} de biotina, 0.5 mg l^{-1} de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 1.0 mg l^{-1} de ácido indol-3-acético (AIA) y 45 g.l^{-1} de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8 antes de la esterilización por autoclave.

A los 30 días de cultivo se observaron las características morfológicas de los embriones somáticos, y se transfirieron a medio de cultivo semisólido de germinación. Este contenía 100% de sales MS, vitaminas MS, 0.5 mg l^{-1} de 6-BAP, 2.0 mg l^{-1} de AIA, 100 mg l^{-1} de mio-inositol, 0.01 mg l^{-1} de Biobrás-6, y 30 g l^{-1} de sacarosa (Kosky *et al*., 2000). El número de embriones somáticos germinados se cuantificó a los 30 días de cultivo. La comparación de los valores del número de embriones somáticos germinados se efectuó mediante la prueba de *Kruskall Wallis*, con un nivel de significación de 95.0%. Se empleó el paquete estadístico SPSS.

Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo

En las fases de formación y maduración de los embriones somáticos se establecieron cinco repeticiones por cada tratamiento (densidad de inoculación) con un diseño experimental completamente aleatorizado. En ambas fases se determinó el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio, Hierro, Cobre, Manganeso y Zinc en el medio de cultivo. Con este propósito se tomaron muestras de 10 ml de medio de cultivo al inicio del cultivo y al final del cultivo (30 días) El análisis de las muestras se realizó por espectroscopia de absorción atómica (SP-9, PYE UNICAM), siguiendo la metodología de Smith y Scherk (1972). La cuantificación Calcio, Magnesio y Potasio se realizó con diluciones a las muestras 1:5 y el contenido de Hierro, Cobre, Manganeso y Zinc se efectuó a partir de la muestra original. Los datos se expresaron en mg l^{-1}.

Los valores del contenido de Calcio, Magnesio, Potasio, Hierro, Cobre, Manganeso y Zinc en el medio de cultivo al inicio y al final del cultivo se compararon mediante la prueba de *Mann Whitney*, con nivel de significación de 95.0%. Se empleó el paquete estadístico SPSS.

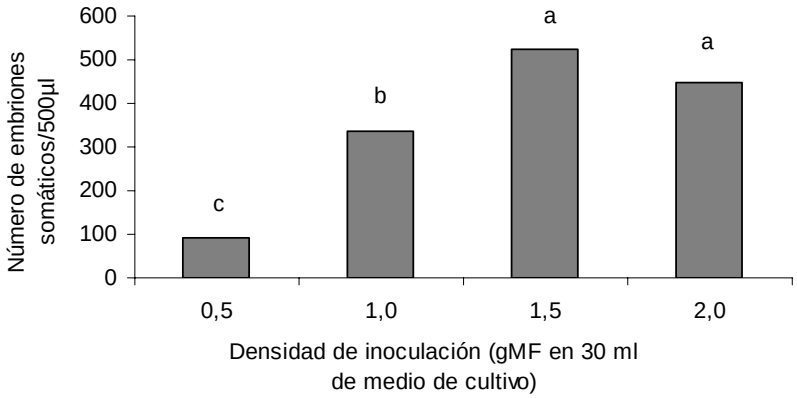
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de embriones somáticos

A los 30 días de cultivo se observó la formación de embriones somáticos a partir de ambas densidades de inoculación de agregados celulares embriogénicos (0.5 y 1.5 gMF); aunque, con diferencias significativas en su número y morfología. El mayor número de embriones somáticos se obtuvo con 1.5 gMF con respecto a la densidad de inoculación de 0.5 gMF (Figura 1).

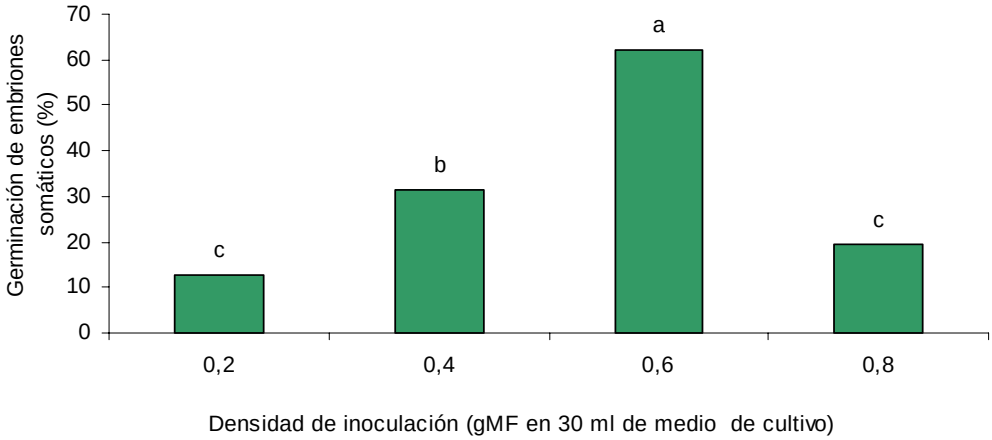
Los embriones somáticos formados con 1.5 gMF presentaron una longitud que osciló entre 0.26 y 0.75mm. Los embriones somáticos formados con 0.5 gMF mostraron mayor longitud que los obtenidos con 1.5 gMF, la cual osciló desde 0.10 hasta 1.0 mm.

Los resultados mostraron la influencia de la densidad de inoculación, utilizada durante la fase de maduración, sobre la germinación de los embriones somáticos del cv. 'FHIA-21'. A los 30 días de cultivo, el mayor porcentaje de germinación correspondió a los embriones cultivados con 0.6 gMF/30ml (62.0%), con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 2).



Barras con letras distintas indican diferencias significativas entre las medias según la prueba Dunnett C, para p≤0.05 (n=20).

Figura 1. Efecto de la densidad de inoculación sobre el número de embriones somáticos formados en el cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB), a los 30 días en medio de cultivo líquido.



Barras con letras distintas indican diferencias significativas entre las medias según prueba Kruskall Wallis, para p< 0.05 (n=20)

Figura 2. Efecto de la densidad de inoculación en la fase de maduración sobre el porcentaje de germinación de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB), a los 30 días de cultivo.

Al analizar el contenido final de nutrientes minerales se observó disponibilidad de todos los elementos minerales analizados en el medio de cultivo de formación de embriones. Sin embargo, los resultados mostraron una mayor reducción en el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio y Zinc cuando se utilizó 1.5 gMF con respecto a 0.5 gMF, con diferencias significativas entre ellos. Para el contenido de Hierro, Cobalto y Manganeso no se observaron diferencias significativas (Tabla 1). Lo anterior evidencia que en la formación de embriones somáticos juegan un papel importante las funciones en que intervienen cada uno de los nutrientes minerales.

En bananos y plátanos, no se han informado estudios científicos que relacionen la importancia de los diferentes nutrientes minerales en el proceso de embriogénesis somática. Sin embargo, en otras especies de plantas se ha descrito el papel significativo del Calcio, Magnesio, Potasio y Zinc en el proceso de embriogénesis somática. Por ejemplo, la participación del Calcio en la embriogénesis somática de zanahoria (*Daucus carota* L.) fue demostrada por Takeda *et al*. (2003) al obtener mayor número de embriones somáticos cuando los explantes fueron colocados directamente en medio de cultivo que contenía Calcio, respecto a los transferidos después de siete días. Estos autores demostraron que el aumento del Calcio libre en el citoplasma coincidía con la inducción del proceso de embriogénesis somática.

Tabla 1. Contenido final de nutrientes minerales en el medio de cultivo de formación de embriones somáticos del cv. 'FHIA-21' (*Musa* AAAB), con 0.5 y 1.5 gMF densidad de inoculación a los 30 días de cultivo.

Nutrientes minerales	Contenido Inicial (mg. l^{-1})	Densidad de inoculación (gMF/30ml) 0.5 Contenido Final	1.5 Contenido Final
Calcio	37.4	24.5 a	22.7 b
Magnesio	21.4	3.2 a	2.0 b
Potasio	913.3	316.9 a	48.3 b
Hierro	1.880	1.284 a	1.302 a
Cobre	0.048	0.027 a	0.025 a
Manganeso	2.656	0.346 a	0.269 a
Zinc	0.286	0.159 a	0.068 b

Medias con letras distintas en una misma fila difieren significativamente según la prueba Mann Whitney para $p<0.05$ (n=5).

Por otra parte, los resultados de Mahalakshmi *et al*. (2007) corroboraron una relación entre la presencia de Calcio y la acción del 2,4-D en la inducción de la respuesta embriogénica, en hojas de trigo (*Triticum aestivum* var. HD 2329). Ellos observaron una reducción del 80.0% de la formación de embriones somáticos cuando el Calcio no se adicionó al medio de cultivo.

Posteriormente, Ghasemi *et al*. (2009) señalaron que el Calcio tuvo un efecto significativo en el proceso de diferenciación de embriones somáticos de zanahoria (*Dacus carrota* cv. Nants). El incremento del Calcio hasta 1.0 Mm en el medio de cultivo aumentó el número de embriones en etapa globular, mientras que los embriones en etapa cotiledonal fueron observados en la mayor concentración de este nutriente mineral. Estos resultados mostraron que el Calcio tiene un efecto directo sobre el embrión somático. Según Mashayekhi (2007), un exceso en la entrada de Calcio en las células hace que se produzca un potencial eléctrico por su acumulación en la pared celular y la membrana de la vacuola, el cual incrementa la polaridad celular y estimula la diferenciación celular.

En el caso del Magnesio, existen evidencias que la omisión de este mineral en el medio de cultivo redujo el número de embriones somáticos en callos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Walker y Sato, 1981). También en el cultivo de melón (*Cucumis melo* L.), Kintzios *et al*. (2004) observaron con la mayor concentración de Magnesio la formación directa de embriones somáticos, mientras que con la menor concentración solamente ocurrió la formación de callos.

Otros autores, como Desai *et al*. (2006), le atribuyeron una función importante al Magnesio por su alta acumulación en los tejidos durante el desarrollo de las diferentes fases de la embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*. L). Estos autores encontraron la mayor acumulación de Magnesio en callos proembriogénicos, o sea al iniciarse la formación de los embriones somáticos. Por su parte, Minyaka *et al*. (2008) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) observaron el efecto positivo del Magnesio y el Potasio en la adquisición de competencia embriogénica de siete genotipos considerados recalcitrantes. Todos estos genotipos fueron capaces de producir embriones somáticos dependiendo de la concentración de $MgSO_4$ y K_2SO_4 en el medio de cultivo.

Por otra parte, los resultados de Hossain *et al*. (1997) indicaron que el Zinc aumenta la actividad de las auxinas lo cual comprobaron por el incremento en el crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de arroz (*Oriza sativa* L.). El efecto beneficioso de este mineral fue también descrito por Echavarri *et al*. (2008), los cuales observaron un aumento (40.0-53.0%) del número de embriones somáticos en diferentes cultivares de cebada (*Hordeum vulgare* L.).

Más recientemente, en una especie de planta medicinal (*Plantago ovata* Forssk), Saha *et al*. (2010) observaron una mayor acumulación de

Potasio, Calcio, Magnesio, Cobre y Zinc en la fase de formación de embriones somáticos lo cual sugiere que estos elementos son importantes para el éxito de la embriogénesis somática.

Maduración de embriones somáticos

Después de 30 días de cultivo, los embriones somáticos maduros mostraron un incremento en su longitud con valores que alcanzaron 7.0 mm. Los embriones que se cultivaron con una densidad de inoculación de 0.6 gMF presentaron menor longitud que los cultivados con 0.2 gMF. El mayor porcentaje de germinación correspondió a los embriones cultivados con 0.6 gMF (62.0%), con diferencias significativas con la densidad de inoculación de 0.2 gMF.

Al analizar el contenido final de nutrientes minerales en el medio de cultivo se observó que existía también disponibilidad de todos los elementos minerales analizados, después de 30 días de cultivo. Una mayor reducción en el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio y Manganeso se produjo cuando se utilizaron 0.2 gMF con respecto a 0.6 gMF, con diferencias significativas. Por el contrario, el contenido de Cobalto y Zinc se redujo significativamente cuando los embriones fueron cultivados con 0.6 gMF. Para el contenido de Hierro no se observaron diferencias significativas (Tabla 2).

El Hierro fue el nutriente mineral de mayor reducción de su contenido en el medio de cultivo, cuando se emplearon ambas densidades de inoculación, lo cual permite deducir que este mineral juega un papel importante en el desarrollo de los embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21'. Lo anterior pudiera estar relacionado con las numerosas funciones celulares en las que interviene. Por ejemplo, los resultados de Lanquar *et al*. (2005) demostraron a través de la participación de las proteínas transportadoras de metales (AtNRAMP3 y AtNRAMP4), que la movilización del hierro vacuolar es esencial durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. En este momento se produce alto consumo de energía por la gran actividad respiratoria y se activan las reacciones de oxidación reducción. Según estos autores, la formación de nuevas mitocondrias para el desarrollo de este proceso requiere de la introducción a las células vegetales de gran cantidad de Hierro y la observación del número de mitocondrias en los tejidos vegetales les permitió validar esta hipótesis.

En plátanos y bananos no se han descrito resultados que relacionen el contenido de nutrientes minerales y su función en el desarrollo de embriones somáticos. Estos resultados abren nuevas interrogantes sobre los requerimientos nutricionales de los embriones somáticos durante la fase de maduración, específicamente en el cv. 'FHIA-21'.

Tabla 2. Contenido final de nutrientes minerales en el medio de cultivo de maduración de embriones somáticos del cv. 'FHIA-21' (*Musa* AAAB), con 0.2 y 0.6 gMF densidad de inoculación a los 30 días de cultivo.

Nutrientes minerales	Contenido Inicial (mg. l^{-1})	Densidad de inoculación (gMF/30ml) 0.2 Contenido Final	0.6 Contenido Final
Calcio	67.4	36.60 b	73.8 a
Magnesio	17.3	6.40 b	14.5 a
Potasio	625.0	287.24 b	606.0 a
Hierro	3.239	1.02 a	1.090 a
Cobre	0.068	0.121 a	0.089 b
Manganeso	3.244	2.578 b	4.201 a
Zinc	1.548	3.049 a	2.036 b

Medias con letras distintas en una misma fila difieren significativamente según la prueba Mann Whitney para $p \leq 0.05$ (n=6).

En otras especies de plantas, muchos progresos se han realizado para el desarrollo y calidad del embrión somático con la modificación del contenido mineral del medio de cultivo. Existen evidencias a través de los resultados de Pullman *et al*. (2003) que un aumento del contenido Hierro durante la fase de maduración, mejoró el crecimiento y desarrollo de embriones somáticos de pino (*Pinus taeda* L.). Estos autores realizaron un análisis comparativo entre el contenido mineral de los embriones somáticos y cigóticos, el cual indicó que los embriones somáticos contenían tres veces más Calcio, 1.8 más de potasio y 17 veces más Boro que los embriones cigóticos.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación mostraron el efecto regulatorio de la densidad de inoculación sobre la formación y desarrollo ontogénico de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21'.

A partir de los resultados se puede concluir que no se comprobó una relación entre el factor densidad de inoculación y el contenido de nutrientes minerales. La formación de un mayor número de embriones somáticos se correspondió con una reducción en el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio y Zinc. La determinación del contenido de nutrientes minerales del medio de cultivo reveló la importancia del hierro en la fase de maduración.

REFERENCIAS

Adelberg, JW, Delgado MP, Tomkins JT (2010) Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. *In Vitro* Cell.Dev. Biol.-Plant. 46: 95-107

Barranco, LA, Gómez-Kosky R, Reyes M, Posada L, Frerie M, Herrera I (2009) Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB). Revista Colombiana de Biotecnología 2: 29-36

Daniels, D, Kosky R, Vega M (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hirbid cultivar FHIA 21 (*Musa* spp. AAAB). *In vitro* Cell. Dev. Biol. 38: 330-333

De Feria, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2009) 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. Biotecnología Vegetal 9(3):131-139

Desai, NS, Joseph D, Suprasanna P, Bapat VA (2006) Study of elemental variations during somatic embryogenesis in sugarcane using photon induced X-ray probe. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research 252 (2): 299-302

Echavarri, B, Soriano M, Cistué L, Valdés P, Castillo AM (2008) Zinc sulphate improved microspore embryogenesis in barley. Plant Cell Tiss Organ Cult. 93: 295-301

Escalant, JV, Teisson C, Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Cell Dev. Biol 30: 181-186

Georget, F, Côte FX, Domergue R, Ferrière N (2000) Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. 'Grande Naine') embryogenic cell suspension. Plant Cell Report. 19: 748-754

Ghasemi, Y, Mashayekhi K, Ghasemnezhad A, Movahhedi SA (2009) The effects of calcium and magnesium on carrot (*Dacus carota* L. cv. Nants) petiole somatic embryogenesis. International Journal of Plant Production 3(4): 1735-6814

Hossain, B, Hirata N, Nagatomo Y, Akashi R, Takaki H (1997) Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture. J. Plant Growth Regul. 16: 239-243

Kintzios, S, Stavropopoulou ER, Skamneli S (2004) Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). Plant Sci. 167: 655-664

Kosky, GR, Gilliard T, Barranco LA, Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (AAAB). InfoMusa 9 (1):12-16

Lanquar, V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. The EMBO Journal. 24: 4041-4051

Mahalakshmi, A, Bhumica S, Jitendra PK, Paramjit K (2007) Role of calcium–calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329). Plant Cell Tiss Organ Cult. 88:167-174

Minyaka, E, Niemenak N, Abdourahamane FS, Ndoumou D (2008) Effect of MgSO 4 and K 2 SO 4 on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. Plant Cell Tiss Organ Cult. 94:149-160

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

Saha, P, Sarmistha SR, Mathummal S, Chakraborty A (2010) Analysis of Trace Elements During different developmental stages of somatic embryogenesis in *Plantago ovata* Forssk Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence. Plant Cell, Tissue Organ Cult 67:55-62

Schenk, RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Canadian Journal of Botany 50: 199-204

Smith, DL, Scherk WG (1972) ASS off analytical chemist. 55-66 pp.

Takeda, T, Inose H, Matsuoka H (2003) Stimulation of somatic embryogenesis in carrot cell by the addition of calcium. Biochemical engineering Journal 14: 143-148

Walker, KA, Sato SJ (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1: 109-121