

# Inducción de embriogénesis somática en *Alstroemeria* spp.

## Induction of somatic embryogenesis in *Alstroemeria* spp.

Iván Guillermo Cruz<sup>1</sup>, Antonio Angarita<sup>2</sup> y Teresa Mosquera<sup>3</sup>

**Resumen:** Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de inducir la embriogénesis somática en el genotipo de *Alstroemeria AAZ59* como alternativa ante las dificultades que presenta su propagación y por su importancia como flor de corte. A tal fin, se evaluó el tipo de explante con mayor potencial embriogénico y su interacción con reguladores de crecimiento, la consistencia del medio de cultivo y el fotoperiodo. Así mismo, se probaron cinco reguladores de crecimiento: 2,4-D, tidiázon (TDZ), picloran, bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB), en tres combinaciones y diferentes concentraciones; también se evaluaron medios de cultivo sólidos con adición de 5,7 g/l de agar y medios líquidos. Se estudiaron diferentes tipos de explantes: tres tipos de hojas en diferentes estados de desarrollo y segmentos de pedicelo provenientes de plantas establecidas en campo, además de segmentos de brotes sacados de plántulas *in vitro*. Todos los tratamientos fueron evaluados bajo dos condiciones de fotoperiodo: la primera condición con 16 horas luz (5.000 lux) y ocho horas de oscuridad, y la segunda condición en oscuridad total. Se logró la embriogénesis somática directa a partir de segmentos de pedicelo y de segmentos de brotes *in vitro*, establecidos en medios de cultivo de consistencia sólida bajo condiciones de oscuridad total y con la interacción de los reguladores de crecimiento TDZ 1,5 mg/l y AIB 0,5 mg/l. Se recomienda continuar con el desarrollo de los estudios para determinar los factores que regulan las etapas de maduración y posterior germinación de los embriones del genotipo de *Alstroemeria AAZ59*.

**Palabras clave:** Reguladores de crecimiento, explantes, fotoperiodo, tidiázon, pedicelo.

**Abstract:** Given the importance of *Alstroemeria* as a cut flower and the difficulties it displays on being propagated, research was carried out to induce somatic embryogenesis, using the *Alstroemeria AAZ59* genotype as an alternative for its propagation. The type of explant having the greatest embryogenic potential was evaluated and its interaction with growth regulators, culture medium consistency and photoperiod. Five growth regulators have been evaluated in three different combinations and concentrations: 2,4-D, thidiazuron (TDZ), picloran, 6-benzylaminopurine (BAP) and indolbutyric acid (IBA). Solid culture mediums having added 5.7 g/l agar and liquid medium were evaluated, as were different kinds of explants: three types of leaves in different stages of development and pedicel segments, both from plants grown in the field and shoot segments corresponding to plantlets grown in *in vitro* conditions. All treatments were evaluated in terms of two photoperiods: the first used a 16-hour light (5,000 lux) and eight-hour dark photoperiod whilst the second photoperiod involved total darkness. Direct somatic embryogenesis was obtained from pedicel segments and *in vitro* shoot segments. These were established in solid medium cultures in total darkness and TDZ 1.5 mg/l and IBA 0.5 mg/l growth regulator interaction. It is recommended that these studies be carried further for determining factors regulating *Alstroemeria AAZ59* genotype embryo maturation stages and their later germination.

**Key words:** Growth regulators, explants, photoperiod, thidiazuron, pedicel.

## Introducción

*ALSTROEMERIA* ES UNA ESPECIE que pertenece a la familia Alstromeriaceae y se propaga por rizomas; sin embar-

go, su constante propagación conduce a pérdida de vigor y a disminución de la productividad. Además, este sistema de propagación incrementa el riesgo de diseminar patógenos. En los sistemas *in vitro* convenciona-

Fecha de recepción: 31 de octubre de 2003.

Aceptado para publicación: 28 de noviembre de 2003.

1 Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: phytovan@yahoo.com

2 Profesor Asistente (q.e.p.d.), Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

3 Profesora Asociada, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

les, *Alstroemeria* presenta baja tasa de multiplicación y riesgos de manejo a consecuencia de la contaminación endógena y la oxidación, todo lo cual genera un alto costo de producción por plántula (US\$5) comparado con otras especies ornamentales; por lo tanto, esta no es una solución factible económicamente para que los productores renueven sus cultivos. Una posible solución podría ser la aplicación de otras técnicas *in vitro* que incrementen la tasa de multiplicación y ayuden a superar las dificultades existentes en esta especie de naturaleza recalcitrante (Hutchinson *et al.*, 1997). En este contexto, surge la necesidad de estudiar diferentes alternativas que ofrece la biotecnología vegetal, como es la embriogénesis somática con fines de propagación vegetativa. Esta técnica consiste en la inducción de embriones de manera directa o indirecta a partir de células somáticas sin la necesidad de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares tienen la capacidad de crecer y formar plantas normales (Kosky, 1998). La embriogénesis somática puede ser inducida a partir de tejidos diferenciados y órganos en muchas especies, por ejemplo el polen, las células de mesófilo, los tallos, raíces y protoplastos. Este proceso es obtenido gracias a la acción de los reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas (Liu *et al.*, 1993).

En el caso de *Alstroemeria* spp. se reporta la obtención de embriones somáticos a partir de secciones de embriones cigóticos, obteniendo embriones globulares en 16 semanas de cultivo mediante el uso de 2,4-D (0,5 - 2,0 mg/l) con adición de BAP (0,5 - 1,0 mg/l) (Van Schaik *et al.*, 1996 y Lin *et al.*, 2000). Trabajos en arroz (Rueb *et al.*, 1994) y cebada (Ruíz *et al.*, 1992), reportan el uso de 2,4-D (1,0 mg/l) y BAP (0,5 mg/l), como reguladores importantes en la inducción de embriones somáticos a partir de explantes de hojas jóvenes. De igual manera, se reporta un estudio en ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), una planta de morfología similar a *Alstroemeria* en la cual el picloran (0,05 mg/l) y 2,4-D (1,0 mg/l) muestran su acción en la inducción de embriogénesis somática. Phillips *et al.* (1987), reportan el uso de picloran (0,1 mg/l) y BAP (0,5 mg/l) como reguladores importantes de la embriogénesis somática en el ajo. Por otro lado, Huettelman y Preece (1993), reportan que el TDZ en cultivos *in vitro* es un regulador de crecimiento que facilita la propagación de muchas especies recalcitrantes, especialmente en la inducción de embriones somáticos utilizando concentraciones entre 0,1 mg/l y 2 mg/l en especies herbáceas y leñosas.

El objetivo en esta investigación fue desarrollar algunos estudios que permitieran la inducción de embriones somáticos como vía para la multiplicación *in vitro* de *Alstroemeria*.

## Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el laboratorio de micropropagación de la empresa Flores de los Andes. Se emplearon brotes *in vitro* y brotes provenientes de campo del genotipo de *Alstroemeria* identificado como AAZ59.

Para la inducción de embriones somáticos se evaluó la interacción de los brotes con el 4-amino-3,5,6-ácido tricloropicolínico (picloran); el 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y la 6-benzilaminopurina (6-BAP). Posteriormente, se evaluó el efecto del 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5il)urea (tidiazuron, TDZ) en interacción con el ácido indol-3-butírico (AIB). Los reguladores de crecimiento 2,4-D, picloran, BAP y AIB, se evaluaron en el rango entre 0 y 1,0 mg/l, mientras el TDZ se evaluó en el rango entre 0 y 2,0 mg/l.

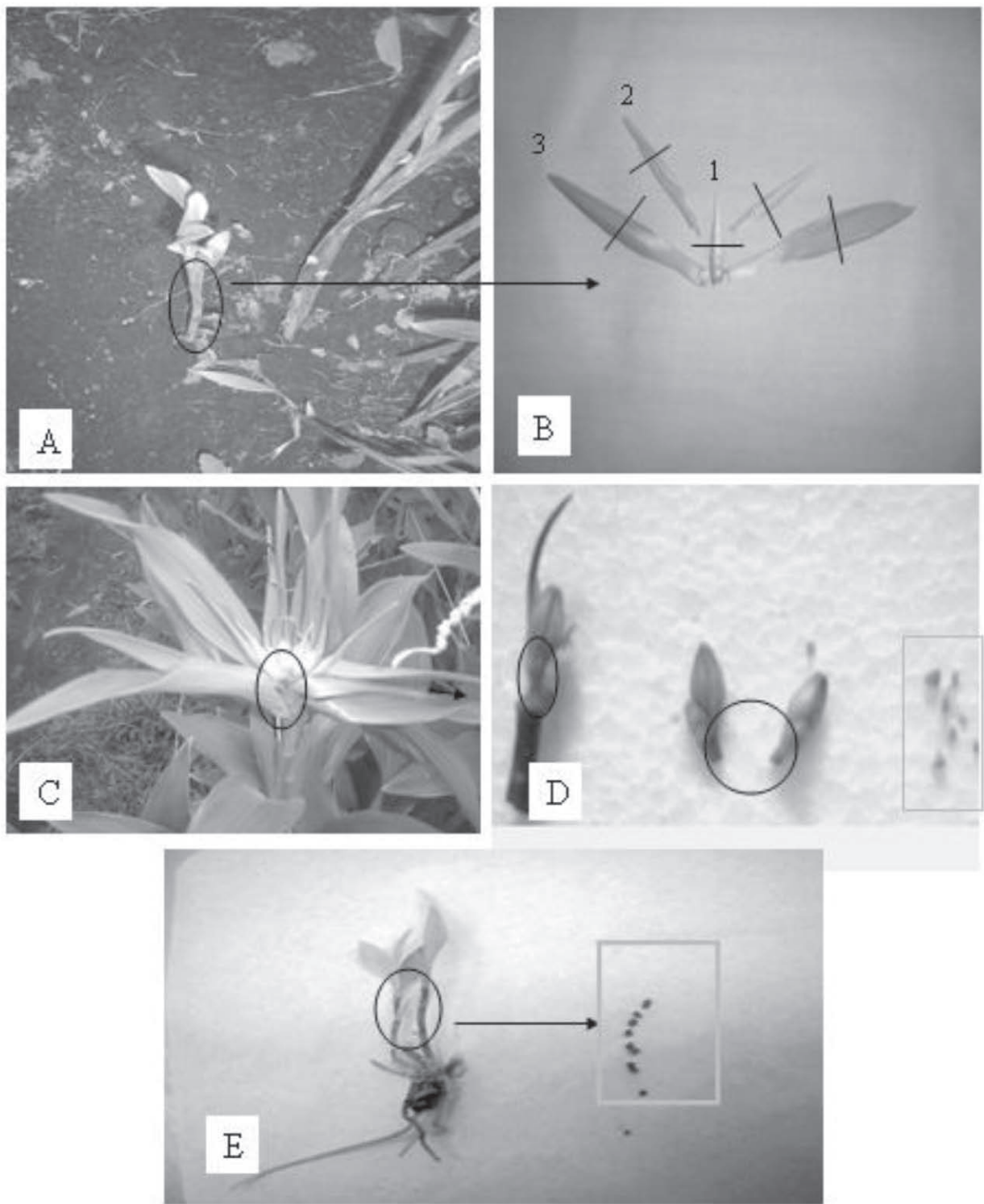
El medio de cultivo básico usado fue el de Murashige y Skoog, 1962 (M&S) y las vitaminas M&S. Los medios contenían 3% de sacarosa y se ajustó el pH a 5,7. Para evaluar la consistencia del medio se trabajaron medios sólidos con adición de 5,7 g/l de agar y medios líquidos desprovistos de agar.

Para los ensayos anteriores se tomaron en campo hojas de 3 cm de longitud, procedentes de segmentos apicales de brotes; a continuación se escindió la base de las hojas para sembrar explantes de 5 x 5 mm.

A fin de determinar el explante con mayor potencial embriogénico, se evaluaron cinco tipos de explantes, así: tres tipos de hojas cada una dividida en base y ápice, pedicelos provenientes de plantas establecidas en campo y brotes de plántulas *in vitro* (Figura 1). Estos ensayos se realizaron después de seleccionar el medio con mayor respuesta en la inducción de embriones somáticos.

Para evaluar el efecto de la luz en la inducción de embriones somáticos se evaluó el fotoperiodo; a tal fin se tomó un tratamiento de 16 horas luz y 8 oscuridad versus condiciones de oscuridad total, simultáneamente con el tipo de explante.

En todos los ensayos realizados se tuvo como base un diseño completamente al azar, y las variables evaluadas



**Figura 1.** Tipos de explantes utilizados en la inducción de embriogénesis somática en *Alstroemeria* genotipo AAZ59. A: brote de campo con 15 cm de longitud; B: brote con los tres tipos de hojas usadas para ensayo y su división en base y ápice; C: brote con pedicelos; D: botones florales individuales en los que se resaltan los pedicelos y los cortes transversales hechos; E: brote de planta establecida *in vitro* y los cortes realizados para su siembra en cajas de petri.

fueron en todos los casos explantes con inducción de embriones somáticos, con inducción de callo y con necrosis, como consecuencia de la fenolización del tejido. Estas respuestas fueron registradas a través del tiempo. Para cada tratamiento se sembraron cinco cajas de petri con diez explantes, para un total de 50 explantes o repeticiones por tratamiento.

## Resultados y discusión

Se encontró efecto de los reguladores de crecimiento, tanto en medios sólidos como en medios líquidos, hallándose tres tipos de respuesta: 1) inducción de embriones somáticos (IES) medida en el momento en el cual los explantes mostraron embriones con forma globular; 2) explantes con necrosis (EN) y, 3) explantes con tendencia a la inducción de callo (IC). Los tratamientos que contenían 2,4-D fueron los únicos en los que se presentó tendencia a la IC.

El efecto de diferentes concentraciones de TDZ y AIB se presentan en la Tabla 1, en la que se indica la mayor inducción de embriones somáticos con la interacción 1,5 mg/l de TDZ y 0,5 mg/l de AIB en medio de cultivo sólido.

Con relación a los ensayos realizados para determinar el explante con mayor potencial embriogénico y el efecto del fotoperiodo, la IES fue mayor cuando se cultivaron explantes provenientes de pedicelos y de brotes *in vitro*, bajo condiciones de oscuridad (Figura 2, Tabla 2).

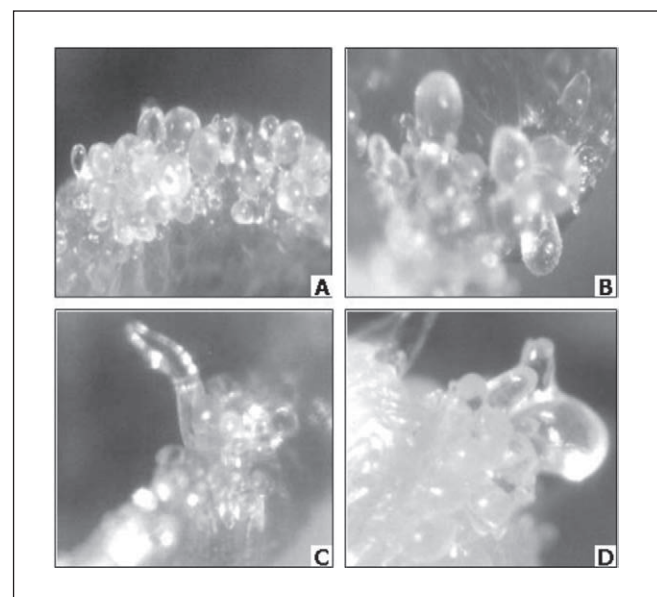
Al respecto, Hutchinson *et al.* (1997) afirman que son dos los requerimientos importantes en la inducción de embriones somáticos en monocotiledóneas; primero, la presencia de reguladores de crecimiento y, segundo, el uso de tejidos jóvenes como embriones cigóticos, yemas, inflorescencias o regiones basales de hojas, los cuales presentan alta actividad meristemática. La inducción de embriones somáticos se puede iniciar a partir de tejidos diferenciados debido al estado totipotencial de las células vegetales.

La formación de la estructura del embrión depende de la habilidad de las células para dividirse y diferenciarse. Por otra parte, tanto la división como la diferenciación celular dependen de la percepción de varias señales externas, ya sea nutrientes, luz, reguladores de crecimiento o señales internas de la célula. En la comunicación de estas señales externas se encuentra la participación

**Tabla 1.** Efecto de los reguladores de crecimiento TDZ y AIB en medio sólido, en la inducción de embriogénesis somática y de necrosis en *Alstroemeria* genotipo AAZ59.

Tratamiento	Reguladores mg/l		Explantes sembrados	No. Explantes IES	No. Explantes EN19 dds
	TDZ	AIB			
1	0.00	0.0	50	-	50
2	0.00	0.5	50	-	50
3	0.00	1.0	50	-	50
4	0.1	0.0	50	10	40
5	0.1	0.5	50	12	38
6	0.1	1.0	50	10	40
7	0.5	0.0	50	16	34
8	0.5	0.5	50	18	32
9	0.5	1.0	50	14	36
10	1.0	0.0	50	22	28
11	1.0	0.5	50	30	20
12	1.0	1.0	50	25	25
13	1.5	0.0	50	29	31
14	1.5	0.5	50	45	5
15	1.5	1.0	50	35	15
16	2.0	0.0	50	37	13
17	2.0	0.5	50	38	17
18	2.0	1.0	50	36	14

IES: inducción de embriones somáticos.  
EN: explantes con necrosis.  
dds: días después de la siembra.



**Figura 2.** Inducción de embriones somáticos. A y B: a partir de segmentos de pedicelos; C: a partir de segmentos de brotes *in vitro*; D: a partir de base de hoja.

**Tabla 2.** Resultados del efecto del fotoperiodo y del tipo de explante en la inducción de embriogénesis somática en *Alstroemeria* genotipo AAZ59 cultivado en un medio sólido con TDZ 1,5 mg/l y AIB 0,5 mg/l.

Tratamiento	Origen del explante	Tipo de explante	Segmento del explante	Condición de luz (*)	IES		EN		
					No.	dds	No.	dds	
1	Campo	Hoja 1	Ápice	Oscuridad	16	12	12	18	
2			Base		22	12	10	22	
3		Hoja 2	Ápice	Oscuridad	17	14	10	16	
4			Base		32	14	14	25	
5		Hoja 3	Ápice	Oscuridad	10	19	15	12	
6			Base		15	19	10	12	
7		Pedicelos	Cortes transversales	Oscuridad	45	10	-	-	
8		In vitro	Brotes	Cortes transversales	Oscuridad	46	10	-	-
9		Campo	Hoja 1	Ápice	Fotoperiodo	10	14	23	10
10				Base		19	14	15	10
11			Hoja 2	Ápice	Fotoperiodo	21	14	26	15
12				Base		28	14	16	15
13	Hoja 3		Ápice	Fotoperiodo	5	19	25	8	
14			Base		10	19	18	8	
15	Pedicelos		Cortes transversales	Fotoperiodo	32	12	10	10	
16	In vitro		Brotes	Cortes transversales	Fotoperiodo	35	10	5	10

El número de explantes sembrados por tratamiento fue de 50.

(\*)Oscuridad: condición de oscuridad total. Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 oscuridad.

IES: explantes con inducción de embriones somáticos.

EN: explantes con nerosis.

dds: días después de la siembra.

de algunos grupos de genes. Un modelo de este proceso se encuentra en *Arabidopsis* con el grupo de genes *CycD*, en donde *CyD<sub>2</sub>* y *CyD<sub>4</sub>* responden a la disponibilidad de azúcar, mientras *CyD<sub>3</sub>* responde a la presencia de citoquininas y brasinoesteroides. En términos generales, los patrones de división celular y la determinación de sus vías de desarrollo parecen estar controladas por señales durante la inducción y los estados tempranos de la embriogénesis. Las señales son importantes porque envían mensajes que indican la expresión de factores específicos de transcripción; más adelante en el desarrollo estos procesos transcripcionales se estabilizan por mecanismos autónomos de la célula (Bonioti y Griffith, 2002).

Las respuestas de los tejidos a la adición externa de reguladores de crecimiento pueden ser el resultado de la interacción con contenidos endógenos de otros reguladores presentes en el tejido vegetal, y en algunos casos, las respuestas dependen de dos o más reguladores o de un regulador que induce la síntesis de otro (Taiz y Zeiger, 1998).

La inducción de embriogénesis somática en los tejidos estudiados puede atribuirse en parte a que las citoquininas son rápidamente tomadas por el tejido vegetal, como lo reportan Taiz y Zeiger (1998). En este caso, el TDZ que se empleó es un regulador sintético que pertenece al grupo de las fenilureas, sustancias conocidas por su alta acción citoquinina, siendo mayor su actividad en comparación con otros reguladores con la misma acción como la zeatina, la bencilaminopurina y la kinetina; ello posiblemente porque el TDZ actúa estimulando la síntesis de citoquininas endógenas y de otros metabolitos afines a ellas (Mok *et al.*, 1982). Además, el TDZ se reporta como altamente resistente a la degradación por acción de la enzima citoquinina oxidasa (Mok *et al.*, 1987), lo cual contribuiría a su mayor actividad, ya que esta enzima inactiva o limita las respuestas de las citoquininas (Kaminek y Armstrong, 1990).

Con referencia al AIB, se reporta que las auxinas promueven la elongación y la división celular en los callos. La división celular se promueve en sinergismo



con una citoquinina; y en el medio de cultivo, el azúcar prolonga la respuesta de la auxina, ya que favorece la actividad osmótica que mantiene la turgencia de las células durante la elongación celular (Taiz y Zeiger, 1998).

De Vries *et al.* (1988), plantearon que la presencia de la auxina en los tejidos estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol (PtdIns), induce alteraciones en el pH del citoplasma y la pared celular y, además, provoca varias divisiones asimétricas al alterar la polaridad de las células, lo cual llevara a la formación del estado globular de los embriones. Los cambios de pH y la hidrólisis de PtdIns son importantes ya que desempeñan el papel de mensajeros secundarios en el transporte y trasducción de señales internas de la célula ante la percepción de una señal. De igual manera, ambos mensajeros estimulan cambios en los niveles libres del ión calcio que se considera el principal mensajero en la trasducción de señales en las células eucarióticas (Bethke *et al.*, 1995).

Ambos reguladores, citoquininas y auxinas, participan en la dinámica del ciclo celular, importante en el proceso de diferenciación y posterior desarrollo de embriones somáticos. Los estudios realizados sugieren que, tanto auxinas como citoquininas, actúan en el control de la actividad de las kinasas dependientes de ciclinas (CDK), y junto con las ciclinas, conforman el complejo enzimático regulador del ciclo celular CDK/ciclinas. Las auxinas regulan la expresión del gen *CDC2* que codifica para la enzima CDK-1. Soni *et al.* (1995), encontraron que en *Arabidopsis* las citoquininas participan en la expresión del gen que codifica la ciclina D3; y que además, la sacarosa está involucrada en la expresión del gen que codifica la ciclina D2. Tanto D2 como D3 hacen parte del grupo de ciclinas que acompañan a las CDK en la progresión de la fase G1 del ciclo celular. La interacción de estas tres señales –auxinas, citoquininas y sacarosa–, favorece la formación de un complejo CDK/ciclinas en la fase G1, el cual permite la transición de la fase G1 a la fase de síntesis (S) del ciclo celular. Además de inducir la expresión de la ciclina D3, las citoquininas actúan en el progreso de la fase G2 a la fase de mitosis (M), lo cual ocurre por la activación del complejo CDK/ciclinas como resultado de la defosforilación de la treonina 14 y la tirosina 15 por una enzima fosfatasa. Es en este punto donde actúan las citoquininas, ya que, como lo plantean Zhang *et al.*

(1996), son ellas las que controlan la actividad de la fosfatasa para la remoción de los grupos fosfatos, permitiendo que el complejo CDK/ciclinas (Cdc2) se active y entre a la fase de mitosis.

La formación de callos en los tratamientos por influencia de 2,4-D y BAP, establece una de las vías para la obtención de embriones somáticos. En este caso, las células no embriogénicas (CsNE) del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Este proceso se conoce como ‘embriogénesis somática indirecta’ y se usa para indicar que una fase se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos; la inducción de la división celular como una respuesta a esta enzima puede resultar en un callo con crecimiento desorganizado o bien en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión (Sharp *et al.*, 1984). La obtención de embriones somáticos a partir de tejidos de hojas, pedicelos y brotes *in vitro* de *Alstroemeria* genotipo AAZ59 se relaciona con la presencia de células somáticas determinadas pre-embriogénicamente (CsDPE). En este caso, un estímulo para la división celular es suficiente para la formación de embriones somáticos a partir del tejido del explante. El proceso es conocido como ‘embriogénesis somática directa’, es decir, la formación de embriones desde una estructura organizada (Sharp *et al.*, 1984).

Por tanto, se puede plantear que en los tejidos seleccionados –y particularmente en la base de hojas, pedicelos y brotes *in vitro* de *Alstroemeria* genotipo AAZ59–, se encuentran células pro-embriogénicamente determinadas que, ante la percepción de ciertas señales, en este caso los reguladores de crecimiento y los nutrientes del medio de cultivo, presentan alta competencia embriogénica y dan origen al desarrollo de embriones somáticos. Esto coincide con los estudios realizados por Guidernoni y Demarly (1988), quienes establecieron la presencia de zonas embriogénicas dentro de la lámina foliar en caña de azúcar; y el trabajo de Pedroso y Pais (1995) en *Camellia japonica*, quienes encuentran tejidos de alta competencia embriogénica, tanto en las hojas, como en segmentos de tallo y de cotiledones.

La oxidación de los explantes fue uno de los resultados más observados en esta investigación. Este fenómeno se presentó en todos los ensayos realizados, pero tuvo mayor incidencia cuando se emplearon medios líquidos bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. La excisión de los explantes generó daño de

las membranas celulares lo que ocasionó liberación de fenoles que oxidaron el material vegetal.

Es importante destacar en esta investigación el hecho de haber logrado la inducción de embriones somáticos a partir de tejido somático, lo cual estaría contribuyendo a mantener la estabilidad genética en las plántulas que se obtengan por este sistema de multiplicación, aspecto importante en la propagación de *Alstroemeria*, especie en la que los genotipos cultivados son híbridos y la propagación vegetativa es fundamental.

Finalmente, vale la pena destacar la importancia de continuar con el desarrollo de nuevos estudios para determinar aquellos factores que regulan la etapa de maduración de los embriones inducidos de *Alstroemeria* genotipo AAZ59, su posterior germinación y la obtención de las plántulas. En esta etapa final es indispensable realizar estudios genéticos para determinar si en el proceso de embriogénesis somática se inducen variantes somaclonales.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Empresa Flores de los Andes Ltda. por la financiación, el apoyo y la disponibilidad del laboratorio de biotecnología.

## Bibliografía

- Bethke, P.C.; S. Gilroy y R.L. Jones. 1995.** Calcium and Plant Hormone. En: Davies, P.J. (ed.). Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Holanda). pp. 298-317.
- Boniotti, M.B. y M.E. Griffith. 2002.** Cross talk between cell division cycle and development in plants. *The Plant Cell* 14, 11-16.
- De Vries, S.C.; H. Booij; P. Meyerink; G. Huisman; H.D. Wilden; L.T. Terry y A. van Kammen. 1988.** Acquisition of embryogenic potential in carrot cell suspension culture. *Planta* 176, 196-204.
- Guideroni, E. y Y. Demarly. 1988.** Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugar plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14, 71-88.
- Huetteman, C.A. y Preece, J.E. 1993.** Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33, 105-119.
- Hutchinson, M.J.; T. Senaratna; J.M. Tsujita y P.K. Saxena. 1997.** Somatic embryogenesis in liquid cultures of a tetraploid *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47, 293-297.
- Kaminek, M. y D.J. Armstrong. 1990.** Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. *Plant Physiology* 93, 1530-1538.
- Kosky, R.G. 1998.** Embriogénesis somática. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 57-79.
- Lin, H.S.; C. Vander Toorn; K.J. Raemakers; R.G. Visser; M.J. de Jeu y E. Jacobsen. 2000.** Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports* 19, 529-534.
- Liu, C.; Z. Xu y N. Chua. 1993.** Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5, 621-630.
- Mok, C.; D.W.S. Mok y D.J. Armstrong. 1982.** Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry* 21, 1509-1511.
- Mok, M.C.; D.W.S. Mok; J.E. Turner y C.V. Mujer. 1987.** Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22, 1194-1197.
- Pedroso, M.C. y M.S. Pais. 1995.** Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43, 147-154.
- Phillips, G.C. y J.F. Hubstenberger. 1987.** Plant regeneration in vitro of select *Allium* species and interspecific hybrids. *HortScience* 22(1), 124-125.
- Rueb, S.; M. Leneman; R.A. Schilperoort y L.A.M. Hensgens. 1994.** Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36, 259-264.
- Ruiz, M.L.; J. Rueda; M.J. Peláez; F.J. Espinosa; M. Candela; A.M. Sendino y A.M. Vásquez. 1992.** Somatic embryogenesis, plant regeneration and variation somaclonal in barley. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28, 97-101.
- Sharp, W.R.; M.R. Sondahl; L.S. Caldas y S.B. Marraffa. 1984.** The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2, 268-310.

**Soni, R.; J.P. Carmichael; Z.H. Shah y J.A.H. Murray. 1995.** A family of cyclin-D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7, 85-103.

**Taiz, L. y E. Zeiger. 1998.** *Plant physiology*. Second edition, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. pp. 472, 543-589, 621-650.

**Van Schaik, C.E.; A. Posthuma; M.S. de Jeu y E. Jacobsen. 1996.** Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced in immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. *Plant Cell Reports* 15, 377-380.

**Zhang, K.; D.S. Letham y P.C.L. Jhon. 1996.** Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200, 2-12.