

Investigación

Patrón proteico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

F. R. Quiroz-Figueroa, S. C. Kú-Rodríguez y V. M. Loyola-Vargas*

Centro de Investigación Científica de Yucatán, calle 43 no. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México.
Tel: (999)-9813961; Fax: (999)-9813900; E-mail: vmloyola@cicy.mx

Recibido el 25 de septiembre del 2002; aceptado el 15 de octubre del 2002

Este trabajo está dedicado al Dr. Barbarín Arreguín en reconocimiento a su invaluable trayectoria científica y su papel de pionero de la Bioquímica Vegetal en México

Resumen. Un amplio número de especies vegetales excretan proteínas al medio de cultivo, algunas de estas proteínas tienen función durante la embriogénesis somática. La mayor parte de la información disponible sobre este campo ha sido obtenida con cultivos celulares de *Daucus carota*, es necesario extender estas áreas de estudio a otros sistemas, como por ejemplo al género *Coffea*. Se obtuvieron cultivos embriogénicos en medio líquido para *Coffea arabica*, se detectaron proteínas extracelulares en el medio condicionado de las líneas embriogénicas, su concentración varió a lo largo de la edad del cultivo. El perfil electroforético obtenido por electroenfoque y SDS-PAGE mostró la presencia de dos proteínas específicas para la condición de embriogénesis ambas con una masa molecular de 27 kDa y con pI 5.7 y 9.4-9.7, respectivamente.

Palabras clave: Proteínas extracelulares, *Coffea arabica*, patrón electroforético.

Abstract. A wide number of plant species excrete proteins into the culture medium; some of them may participate in the somatic embryogenesis process. Most of the available information in this field of research has been obtained using cell suspension cultures of *Daucus carota* as model. However, it is necessary to extend this research area to other systems, such as *Coffea* spp. During this investigation *Coffea arabica* embryogenic suspension cultures were obtained and the excreted proteins into the culture medium were studied. The extracellular protein concentration of the conditioned culture medium varied through the cycle culture of the cells. The electrophoretic profile obtained by electrofocus and SDS-PAGE showed the presence of two specific proteins, of 27 kDa and a pI of 5.7 and 9.4-9.7 respectively, which are excreted into the culture medium during the induction of the somatic embryogenesis.

Keywords: Extracellular proteins, *Coffea arabica*, electrophoretic pattern.

Introducción

La mayoría de las especies vegetales cultivadas *in vitro* excretan proteínas al medio de cultivo. Entre las proteínas excretadas por los cultivos se han detectado actividades enzimáticas de peroxidasa [1], fosfatasa [2], fumarasa [3], estearasa [4], proteasa [5], α -manosidasa [6], quitinasa [7] y de β -1, 3 glucanasa [6]. También se han identificado proteínas tales como: inhibidores de proteasas [8, 9], una proteína del tipo de la extensina [10], proteínas relacionadas con la patogenicidad [11], proteínas relacionadas con choque térmico [12], una proteína transferidora de lípidos [13] así como arabinogalactoproteínas [14]. La mayoría de las proteínas excretadas al medio de cultivo pertenecen al grupo de proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas. De las proteínas extracelulares las que más se han estudiado han sido las peroxidasas [15-17]. Se desconoce cuál es la función de las proteínas en el medio de cultivo; sin embargo, se puede especular que una posible función es la modificación de los polímeros de la pared celular. Al igual que se ha observado que algunas de estas proteínas juegan un importante papel en el desarrollo

del proceso de la embriogénesis somática, ya sea promoviendo o inhibiéndolo (para revisión véase [18, 19]).

Entre las proteínas que tienen capacidad de promover la embriogénesis somática se identificó una con actividad de peroxidasa, la que es capaz de restablecer la capacidad embriogénica inhibida por la tunicamicina en suspensiones celulares de *Daucus carota*, esta peroxidasa fue purificada del medio de cultivo de las líneas silvestres o sin tratamiento con tunicamicina [20].

La línea celular mutante *ts11* de *D. carota* puede desarrollar el proceso de la embriogénesis somática en forma normal a 24 °C, en tanto que a 32 °C el proceso no va más allá del estadio globular, a menos de que el sistema sea complementado con medio condicionado de cultivos silvestres o del mismo cultivo a 24 °C [21]. Los embriones *ts11* respondieron a la adición de una glucoproteína ácida, la endoquitinasa-EP3- [22, 23], aumentando el número de embriones globulares a 32 °C [24] y restaurando el sistema endomembranal de los embriones *ts11* [25]. Esta mutante no es capaz de llevar a cabo apropiadamente la glucosilación de algunas proteínas a la temperatura no permisible.

Las proteínas de tipo estructural también se les ha implicado en varios procesos de diferenciación celular, entre éstos la embriogénesis somática [26]. Kreuger y van Holst [27, 28], observaron que las líneas celulares en medio líquido excretan un grupo característico de arabinogalactoproteínas (AGPs), la composición de éstas cambia con la edad del cultivo [27] y la composición del tipo celular [29]. La adición de AGPs a líneas celulares no-embriogénicas promueve la inducción del potencial embriogénico [27], mientras que otro grupo de AGPs no afecta el proceso [30]. Egertsdotter *et al.* [31, 32], usando como modelo de estudio al abeto (*Picea abies*), determinaron que la adición de proteínas extracelulares de una línea embriogénica normal, a una línea embriogénica anormal tiene la capacidad de restaurar la morfología de los embriones y que entre las proteínas activas se localizaron las AGPs.

Toonen *et al.* [30], han propuesto la existencia de células nodrizas que podrían producir factores que promueven la embriogénesis y serían las AGPs las que promoverían el desarrollo de estas células nodrizas. Pennell *et al.* [26] y McCabe *et al.* [33] localizaron un epítipo, reconocido por el anticuerpo monoclonal JIM8, en las paredes celulares de cierto tipo de células embriogénicas, que no se encuentra en las células no embriogénicas y propusieron que puede ser empleado como un marcado temprano de la embriogénesis somática. Además, demostraron que determinado tipo celular fue competente para formar embriones somáticos y que cuando se adicionó el medio condicionado, proveniente de cultivos compuestos por células positivas al JIM8, a los cultivos formados por células negativas a JIM8, éstos formaron y desarrollaron embriones somáticos. Lo interesante en dicho trabajo es que únicamente un sólo tipo de células hizo la diferencia entre los dos grupos.

En el caso de las proteínas extracelulares que inhiben la embriogénesis somática Gavish *et al.* [34, 35], utilizando como modelo de estudio cultivos de *Citrus aurantium*, determinaron que el desarrollo normal de los embriones somáticos dependió de manera obligatoria de la ausencia de proteínas glucosiladas de entre 53 y 57 kDa (kilodalton). Por otro lado, Coutos-Thevenot *et al.* [36] trabajando con suspensiones celulares de un híbrido de uva, evidenciaron el mismo efecto inhibitorio en la embriogénesis, concluyendo que son las moléculas extracelulares mayores de 10 kDa las involucradas en este efecto, posteriormente se demostró que fue un mecanismo proteolítico el implicado en su inhibición [37].

El café es una planta de importancia agrícola en diversos países. Se han reportado varios sistemas para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* en *Coffea* spp. Staritsky [38] reportó por primera vez la obtención de embriones somáticos en *Coffea canephora* y Herman y Haas [39] para *Coffea arabica*. A partir de entonces se han desarrollado varios protocolos para la obtención de la embriogénesis somática en el género *Coffea* [40, 41, 42, 43]. Actualmente poco se sabe acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares de la inducción de la embriogénesis somática [44, 45, 46, 47] y crecimiento celular [48] en este género. El propósito de este trabajo fue analizar los perfiles electroforéticos en geles de

poliacrilamida, bajo condiciones desnaturizantes, en una y dos dimensiones, así como por electroenfoque de las proteínas extracelulares durante el crecimiento sin organización, y después de la inducción de la embriogénesis somática en cultivos *in vitro* de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo en medio líquido.

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de cultivo. Los cultivos embriogénicos de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo fueron mantenidos en medio líquido y la embriogénesis fue iniciada como se describió previamente Quiroz-Figueroa [49].

Concentración de proteína extracelular. El medio de cultivo libre de células fue liofilizado y resuspendido en un volumen igual al 10 % del volumen inicial, el resuspendido fue fraccionado en un equipo de ultrafiltración (Ultrafiltration Cell, model 8050, Amicon Corp.) utilizando membranas con un tamaño de exclusión de 10 kDa, hasta un volumen cercano al 1 % del volumen inicial, después fue liofilizado y resuspendido en un amortiguador de citrato-fosfatos (pH 5.0, 1 mM PMSF, 0.157 mM leupeptina, y 5 mM DTT).

Cuantificación de proteína. El contenido de proteína fue cuantificado por el método de Peterson [50]. Se utilizó albúmina sérica bovina para realizar la curva estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis de los patrones electroforéticos en una dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 10 % bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE: geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes) con base en el sistema discontinuo propuesto por Laemmli [51], cargando 5 µg de proteína total por carril. El análisis de los patrones electroforéticos en dos dimensiones se llevó a cabo con base al protocolo propuesto por Robertson *et al.* [52], adicionando 50 µg de proteína total. Las bandas proteicas fueron visualizadas por tinción con plata amoniaca con base en el protocolo de Wray *et al.* [53]. El electroenfoque fue realizado en geles de poliacrilamida al 7.5 % con un gradiente de pH de amplio rango (Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte, BIO

Tabla 1. Concentración de proteína extracelular por mL de medio de cultivo bajo condiciones de propagación (S1) e inducción de la embriogénesis somática (S3).

Edad del cultivo (día)		Proteína Extracelular (µg ml ⁻¹ medio)
S1	0	0.96
	14	24.05
S3	0	0.49
	12	0.54
	16	7.09
	24	9.98

RAD), las bandas fueron visualizadas siguiendo el protocolo de Heukeshoven y Dernick [54].

Resultados y discusión

Cuantificación de proteína extracelular. Se cuantificó el contenido de proteína total en los concentrados proteicos extracelulares (> 10 kDa) obtenidos a partir del medio condicionado. En ambas condiciones de propagación (S1) e inducción de la embriogénesis somática (S3), se detectó proteína en el medio de cultivo (Tabla 1). Bajo la condición de propagación, en el día cero, hubo una concentración de $0.96 \mu\text{g ml}^{-1}$ medio y la cantidad aumentó con la edad del cultivo, alcanzando un valor de $24 \mu\text{g ml}^{-1}$ medio para el día de resiembra (día 14), lo anterior representa un incremento de 25 veces con respecto al día cero. Durante la inducción de la embriogénesis, la concentración de proteína extracelular aumentó conforme avanzó la edad del cultivo. Durante los primeros 12 días de inducción el aumento fue pequeño ($0.49 \mu\text{g ml}^{-1}$ en el día cero y $0.54 \mu\text{g ml}^{-1}$ en el día 12), pero éste alcanzó una concentración de $9.98 \mu\text{g ml}^{-1}$ en el día 24, representando un incremento de 20 veces con respecto al día cero.

En un amplio número de especies vegetales cultivadas *in vitro* se ha reportado la presencia de proteínas extracelulares, por ejemplo, en *Hordeum vulgare* [55] se ha reportado hasta una concentración de $105 \mu\text{g ml}^{-1}$ medio en el día de resiembra, mientras que la concentración en el día 25 de inducción de la embriogénesis somática fue de $225 \mu\text{g ml}^{-1}$ medio. Para suspensiones celulares de *Solanum tuberosum* [56] se ha reportado la presencia de proteína extracelular y su aumento con la edad del cultivo. Un comportamiento similar se ha observado en *Raphanus sativus* [57]. En suspensiones celulares de *Coffea arabica* se ha reportado que durante el crecimiento de una línea celular, la acumulación de proteína extracelular alcanzó una concentración de $63 \mu\text{g ml}^{-1}$ medio en el día 24, iniciándose la secreción de una manera lenta, pero ésta aumento rápidamente después del día 12 de cultivo [48]. Un comportamiento similar se observó durante el período de inducción de la embriogénesis somática. Las diferencias notadas en la concentración de proteína extracelular entre las diferentes especies podría deberse a la especie *per se*, a la densidad del inóculo inicial, a las características de los agregados celulares y/o al estadio fisiológico de los cultivos.

Análisis de los patrones electroforéticos de las proteínas extracelulares. El perfil proteico extracelular obtenido por separación por SDS-PAGE reveló diferencias mínimas cualitativas (Fig. 1). La poza de proteínas estuvo compuesta por polipéptidos con pesos moleculares entre 15 y 61 kDa, conformada principalmente por proteínas de bajo peso molecular. Con base en el nivel de detección, las proteínas extracelulares se pueden clasificar en constitutivas (21, 23, 29 y 40 kDa); que aumentan con la edad del cultivo (26, 31, 44, 52, 53 y 61 kDa) y específica (27 kDa), esta última observada únicamente en S3 (Fig. 1, flecha). En *D. carota* [20] se identificó a una

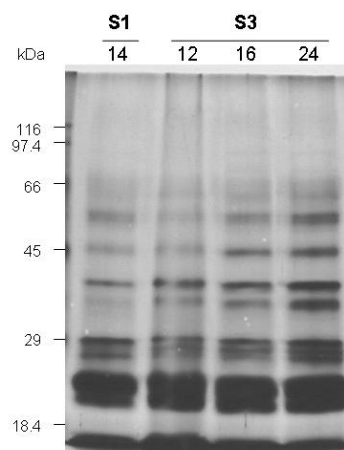


Fig. 1. Perfil electroforético de las proteínas extracelulares bajo condiciones de propagación (S1) e inducción (S3) de la embriogénesis somática. La separación fue realizada en un gel de poliacrilamida al 10 % y teñido con plata amoniacal. Los números en la parte superior del gel corresponden a la edad del cultivo en días y los números en la izquierda representan la masa molecular en kDa de proteínas estándar. La flecha indica la posición del bandeo específico para la condición de embriogénesis.

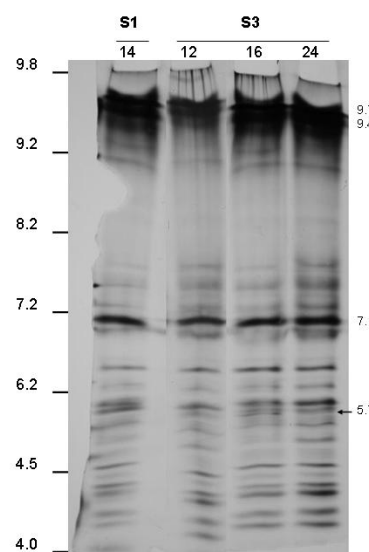


Fig. 2. Proteína extracelular proveniente de medio condicionado bajo condiciones de propagación (S1) e inducción de la embriogénesis somática (S3), separadas por electroenfoque en un gradiente de pH entre 3.4 y 10. La separación fue realizada en un gel de poliacrilamida al 7.5 %. Las proteínas fueron visualizadas con plata amoniacal. Los números en la parte superior del gel corresponden a la edad del cultivo en días. Los números en el lado izquierdo representan el pH, medido con un electrodo capilar. Los números en el lado derecho representan el pI de algunas proteínas. La flecha señala una banda específica de la condición S3.

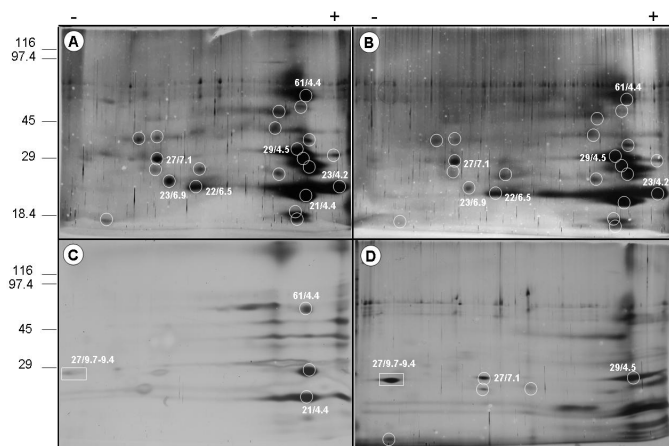


Fig. 3. Patrón electroforético en dos dimensiones de las proteínas extracelulares bajo condición de propagación en el día 14 (A), bajo inducción de la embriogénesis en el día 12 (B), 16 (C) y 24 (D). Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en cada separación. Las bandas proteicas fueron visualizadas con tinción de plata. Los números en la zona izquierda representan la masa molecular en kDa de proteínas estándar. Los signos en la parte superior indica la zona básica (-) y ácida (+). Los círculos representan proteínas detectadas constitutivamente. Los rectángulos representan a la proteína específica de los días 16 y 24 en S3.

proteína extracelular responsable en la restauración de la embriogénesis en cultivos inhibidos por tunicamicina, dicha proteína presentó actividad de peroxida con un pI de 7.6 y un peso de 38 kDa, muy cercano al peso de la banda proteica observada exclusivamente en nuestros cultivos en S3. Un total de 10 bandas proteicas fueron detectadas por SDS-PAGE, el patrón proteico extracelular presentado en este trabajo fue menos complejo que los observados en suspensiones celulares de *Spinacia oleracea* con 16 bandas proteicas [1], *D. carota* con 15 diferentes proteínas [58], *Picea abies* con 20 polipéptidos [31] y *C. arabica* con 30 bandas proteicas [44]. En general, las proteínas extracelulares secretadas hacia el medio de cultivo en diversas especies presentan pesos moleculares entre 10 y 96 kDa.

El perfil electroforético de las proteínas extracelulares separadas por electroenfoque (gradiente de pH de 3.5 a 10) fue más complejo (Fig. 2) que con respecto al obtenido por SDS-PAGE (Fig. 1). Se observaron aproximadamente 26 bandas proteicas, con pI's (punto isoeléctrico) que van desde ácidos a muy básicos, en el rango básico se observaron 3 proteínas con pI's de entre 9.4-9.7, una proteína con un pI de 7.1 fue observada en forma abundante. El mayor número de bandas proteicas se encontró en el rango ácido-neutro. Cuando se comparó el perfil proteico de las proteínas extracelulares en S1, día 14 con respecto a S3, se observó un patrón muy similar, con excepción de una proteína ácida con un pI de 5.7 que estuvo presente en S3 (Fig. 2, flecha) pero ausente en S1. El pH del medio de cultivo de las líneas celulares embriogénicas en *C. arabica* fluctúa entre 4 y 5, bajo estas condiciones se esperaría la presencia de proteínas ácidas, pero, el perfil prote-

ico separado por electroenfoque es más complejo. Por ejemplo, el perfil proteico extracelular de *Solanum tuberosum* separado por electroenfoque reveló que las bandas proteicas se distribuyeron a lo largo del rango de pH de entre 3.5 a 9.5 [56]. Proteínas extracelulares básicas con un pI cercano a 9 fueron detectados en cultivos de *D. carota*, algunas de estas proteínas presentaron actividad para peroxidasas. En *Dactylis glomerata* el patrón isoenzimático revelado para estearasa estuvo conformado principalmente de isoformas ácidas.

Para una caracterización más precisa de las proteínas extracelulares se realizaron separaciones electroforéticas en dos dimensiones. El patrón proteico visualizado en S1 día 14 (Fig. 3A) y S3 día 12 (Fig. 3B) fue muy similar en el número de polipéptidos, contabilizándose un total de 22 manchas. Sin embargo, cuando se realizaron las separaciones de las proteínas en S3 día 16 y 24, se pudieron localizar algunas proteínas adicionales (véase Fig. 3C y D, comparar con A, B). Una mancha de aproximadamente 27 kDa y pI de 9.7-9.4 fue visible en las muestras S3 día 16 (Fig. 3C rectángulo) y 24 (Fig. 3D rectángulo) pero ausente S1 día 14 (Fig. 3A) y S3 día 12 (Fig. 3B). Esa mancha podría corresponder a la proteína observada en la Fig. 1 (flecha) que fue específica para la condición de embriogénesis, pero en el análisis del perfil de las proteínas separadas por electroenfoque ninguna fue condición específica en la zona básica. Una posibilidad es que esta proteína tiene un pI similar a las observadas en 9.7-9.4 y coemigran con otra del mismo pI, enmascarándose en el momento de revelado.

En suma, las suspensiones celulares de *Coffea arabica* empleadas en este estudio excretan proteínas al medio de cultivo de forma importante. Algunas de estas proteínas son específicas de la condición estudiada; por ejemplo, de la inducción de la embriogénesis somática. Este trabajo sienta la base para un estudio más profundo sobre la naturaleza de las proteínas que son excretadas al medio de cultivo por las suspensiones celulares.

Reconocimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico en la parte de cultivo de tejidos de Marcela Méndez-Zeel. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) subvenciones no. 4123P-N y 31816-N y becas a F.R.Q.F (116916) y S.C.K.R (Exp. 1240, SNI).

Referencias

1. Fry, S. C. *Phytochemistry* **1980**, 19, 735-740.
2. Ciarrocchi, G.; Cella, R.; Nielsen, E. *Physiol. Plant.* **1981**, 53, 375-377.
3. Kim, S. H.; Lee, W. S. *Plant Cell Rep.* **2002**, 20, 1087-1092.
4. Chibbar, R. N.; Plowick, P. L.; Newsted, W. J.; Shyluk, J.; Goerges, F. *Plant Cell Tissue Org. Culture* **1989**, 18, 47-53.
5. Gavish, H.; Vardi, A.; Fluhr, R. *Physiol. Plant.* **1991**, 82, 606-616.
6. Kunze, I.; Kunze, G.; Bröcker, M.; Manteuffel, R.; Meins, F., Jr.; Müntz, K. *Planta* **1998**, 205, 92-99.

7. Esaka, M.; Enoki, K.; Kouchi, B.; Sasaki, T. *Plant Physiol.* **1990**, 93, 1037-1041.
8. Carlberg, I.; Jonsson, L.; Bergenstrahle, A.; Soderhall, K. *Plant Physiol.* **1987**, 84, 197-290.
9. Ojima, A.; Shiota, H.; Higashi, K.; Kamada, H.; Shimma, Y.; Waba, M.; Satto, S. *Plant Mol. Biol.* **1977**, 34, 99-109.
10. Kawasaki, S. *Plant Cell Physiol.* **1989**, 30, 259-265.
11. Helleboid, S.; Bauw, G.; Belingheri, L.; Vasseur, J.; Hilbert, J. L. *Planta* **1998**, 205, 56-63.
12. Mita, G.; Nocco, G.; Leuci, C.; Greco, V.; Rampino, P.; Perrotta, C. *Plant Cell Rep.* **1997**, 16, 792-796.
13. Sterk, P.; Booij, H.; Schellekens, G. A.; Van Kammen, A.; De Vries, S. C. *The Plant Cell* **1991**, 3, 907-921.
14. Fincher, G. B.; Stone, B. A.; Clarke, A. E. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1983**, 34, 47-70.
15. Chibbar, R. N.; Van Huystee, R. B. *Plant Physiol.* **1984**, 75, 956-958.
16. Moreno, O. A.; Vazquez-Duhalt, R.; Nolasco, H. *Plant Cell Rep.* **1990**, 9, 147-150.
17. Shetty, K.; Bothra, D.; Crawford, D. L.; Korus, R. A. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, 24/25, 213-221.
18. Van Engelen, F. A.; De Vries, S. C. *Trends Genet.* **1992**, 8, 66-70.
19. Quiroz-Figueroa, F. R.; Rojas-Herrera, R.; Sánchez-Teyer, F.; Loyola-Vargas, V. M. En: *Simposia académico en honor de la Dra. Estela Sánchez Quintanar*; Bernal-Lugo, I., Loza, H., Eds.; Facultad de Química, UNAM: México, **2000**; pp 9-19.
20. Cordewener, J.; Booij, H.; Van der Zandt, H.; Van Engelen, F. A.; Van Kammen, A.; De Vries, S. C. *Planta* **1991**, 184, 478-486.
21. Lo Schiavo, F.; Giuliano, G.; De Vries, S. C.; Genga, A.; Bollini, R.; Pitto, L.; Cozzani, F.; Nuti-Ronchi, V.; Terzi, M. *Mol. Gen. Genet.* **1990**, 223, 385-393.
22. De Jong, A. J.; Cordewener, J.; Lo Schiavo, F.; Terzi, M.; Vandekerckhove, J.; Van Kammen, A.; De Vries, S. C. *Plant Cell* **1992**, 4, 425-433.
23. De Jong, A. J.; Hendriks, T.; Meijer, E. A.; Penning, M.; Lo Schiavo, F.; Terzi, M.; Van Kammen, A.; De Vries, S. C. *Devel. Genet.* **1995**, 16, 332-343.
24. Kragh, K. M.; Hendriks, T.; De Jong, A. J.; Lo Schiavo, F.; Bucherna, N.; Hojrup, P.; Mikkelsen, J. D.; De Vries, S. C. *Plant Mol. Biol.* **1996**, 31, 631-645.
25. Baldan, B.; Guzzo, F.; Filippini, F.; Gasparian, M.; LoSchiavo, F.; Vitale, A.; De Vries, S. C.; Mariani, P.; Terzi, M. *Planta* **1997**, 203, 381-389.
26. Pennell, R. I.; Janniche, L.; Scofield, G. N.; Booij, H.; De Vries, S. C.; Roberts, K. *J. Cell Biol.* **1992**, 119, 1371-1380.
27. Kreuger, M.; Van Holst, G. J. *Planta* **1993**, 189, 243-248.
28. Kreuger, M.; Van Holst, G. *Planta* **1995**, 197, 135-141.
29. Van Hengel, A. J.; Van Kammen, A.; De Vries, S. C. *Physiol. Plant.* **2002**, 114, 637-644.
30. Toonen, M. A. J.; Schmidt, E. D. L.; Van Kammen, A.; De Vries, S. C. *Planta* **1997**, 203, 188-195.
31. Egertsdotter, U.; Mo, L. H.; Von Arnold, S. *Physiol. Plant.* **1993**, 88, 315-321.
32. Egertsdotter, U.; Von Arnold, S. *Physiol. Plant.* **1995**, 93, 334-345.
33. McCabe, P. F.; Valentine, T. A.; Scott, F. L.; Pennell, R. I. *The Plant Cell* **1997**, 9, 2225-2241.
34. Miller, S. A. *Adv. Bot. Res.* **1996**, 23, 73-102.
35. Gavish, H.; Vardi, A.; Fluhr, R. *Planta* **1992**, 186, 511-517.
36. Coutos-Thévenot, P.; Maes, O.; Jouenne, T.; Mauro, M. C.; Boulay, M.; Deloire, A.; Guern, J. *Plant Sci.* **1992**, 86, 137-145.
37. Maës, O.; Coutos-Thévenot, P.; Jouenne, T.; Boulay, M.; Guern, J. *Plant Cell Tissue Org. Culture* **1997**, 50, 97-105.
38. Staritsky, G. *Acta Bot. Need.* **1970**, 19, 509-514.
39. Herman, E. B.; Haas, G. J. *HortScience* **1975**, 10, 588-589.
40. Söndahl, M. R.; Sharp, W. R. Z. *Pflanzenphysiol.* **1977**, 81, 395-408.
41. Söndahl, M. R.; Spahlinger, D.; Sharp, W. R. Z. *Pflanzenphysiol.* **1979**, 94, 101-108.
42. Dublin, P. *Café Cacao Thé* **1981**, 25, 237-242.
43. Yasuda, T.; Fujii, Y.; Yamaguchi, T. *Plant Cell Physiol.* **1985**, 26, 595-597.
44. Menéndez, A.; de Garcia, E. G.; Nieto, M. S. *Plant Cell Rep.* **1994**, 13, 197-202.
45. Menéndez-Yuffá, A.; De García, E. *Phyton* **1996**, 58, 15-22.
46. Rojas-Herrera, R.; Quiroz-Figueroa, F. R.; Monforte-González, M.; Sánchez-Teyer, F.; Loyola-Vargas, V. M. *Mol. Biotechnol.* **2002**, 21, 43-50.
47. Rojas-Herrera, R.; Loyola-Vargas, V. M. *Plant Sci.* **2002**, in press.
48. Orwell, G. *Animal farm*; The Easton Press: Norwalk, Connecticut, 2002; pp 1-118.
49. Quiroz-Figueroa, F. R.; Fuentes-Cerda, C. F. J.; Rojas-Herrera, R.; Loyola-Vargas, V. M. *Plant Cell Rep.* **2002**, 20, 1141-1149.
50. Peterson, G. L. *Anal. Biochem.* **1977**, 83, 346-356.
51. Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
52. Robertson, E. F.; Dannelly, H. K.; Malloy, P. J.; Reeves, H. C. *Anal. Biochem.* **1997**, 167, 290-294.
53. Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, V. P.; Hancock, R. *Anal. Biochem.* **1981**, 118, 197-203.
54. Heukeshoven, J.; Dernick, R. *Electrophoresis* **1985**, 6, 103-112.
55. Nielsen, K. A.; Hansen, I. B. *J. Plant Physiol.* **1992**, 139, 489-497.
56. Bredemeijer, G. M. M.; Burg, H. C. J.; Sree Ramulu, K.; Dijkhuis, P. *Acta Bot. Need.* **1985**, 34, 325-335.
57. Moreno-Valenzuela, O. A.; Vazquez-Duhalt, R.; Ochoa, J. L. *Plant Cell Tissue Org. Culture* **1989**, 18, 321-327.
58. De Vries, S. C.; Booij, H.; Janssens, R.; Vogels, R.; Saris, L.; Lo Schiavo, F.; Terzi, M.; Van Kammen, A. *Devel. Genet.* **1988**, 2, 462-476.