



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

**Embriogénesis somática y regeneración de
plantas de *Medicago arborea* L.: Valoración
como forrajeras.**

Piedad Gallego Nogueras

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

FACULTAD DE BIOLOGÍA

2013



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

D^a. NIEVES VILLALOBOS JUÁREZ Y D. HILARIO GUERRA FERNÁNDEZ, PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada **“Embriogénesis somática y regeneración de plantas de *Medicago arborea* L.: Valoración como forrajeras”** ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, por la licenciada D^a Piedad Gallego Nogueras y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Salamanca, a nueve de enero de dos mil trece.

D^a Nieves Villalobos Juárez

D. Hilario Guerra Fernández

D^a BERTA DOPICO RIVELA, CATEDRÁTICA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICO

Que la presente Memoria titulada **“Embriogénesis somática y regeneración de plantas de *Medicago arborea* L.: Valoración como forrajeras”** ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Doctores D^a Nieves Villalobos Juárez y D. Hilario Guerra Fernández, por la licenciada Piedad Gallego Nogueras y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a nueve de enero de dos mil trece.

D^a Berta Dopico Rivela

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo: Dra. D^a Nieves Villalobos Juárez y Dr. D. Hilario Guerra Fernández, por la confianza que han demostrado al permitirme trabajar con ellos, por sus enseñanzas, su amistad y porque gracias a su constancia y comprensión este trabajo ha llegado a su fin.

También tengo que dar las gracias al profesor Dr. D. Antonio Blázquez, por su ayuda incondicional y la dirección de la parte estadística, imprescindible para la realización de este trabajo.

Al profesor Dr. D. Ángel Alonso Mateos del Dpto de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Ciencias Químicas por poner a mi disposición todos sus conocimientos y las técnicas en la determinación del nitrógeno y la composición de iones.

Al Departamento de Biología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Complutense de Madrid por su buena acogida y sus aportaciones en el estudio de isoenzimas, principalmente al Dr. D. Juan Pedro Martín por facilitarme las accesiones de *Medicago arborea* que me han permitido llevar a cabo los estudios nutricionales.

A la Dra. D^a Lola Gutiérrez de la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid por su amabilidad y su inestimable ayuda incluso en los momentos duros.

A la Dra. D^a Luisa Martín del Dpto de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid por sus valiosos consejos y estar siempre disponible para cualquier consulta.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología Vegetal de Farmacia: Jorge Fernández, Purificación Corchete, Margarita Cacho y Juana Elena por permitirme formar parte del departamento, su apoyo y por hacer que fuera una más durante tantos años.

A todos los que estaban cuando llegué al departamento y a todos los que pasaron después por hacerme el trabajo más agradable.

A los miembros del Departamento de Fisiología Vegetal de Biología por su amabilidad, consejos y apoyo en todos estos años. Especialmente a Heli, Charo y Loli que nos hacen el trabajo mucho más fácil.

A Óscar Hita y Carmen Lafarga que me introdujeron en el mundo de la embriogénesis y me mostraron una amistad que se mantiene a pesar de la distancia.

A los compañeros del IES Francisco Salinas que no han dudado en prestarme su ayuda en las cuestiones informáticas. Sobre todo a Juan Luis y Carlos que han soportado mis agobios y han hecho que las mañanas de trabajo fueran más agradables.

A todos mis amigos por sus ánimos y los momentos de relax que me han proporcionado, sobre todo en la parte final del trabajo.

A mi familia, por la paciencia que han tenido, su confianza y el apoyo que me han mostrado en todo momento. Principalmente a mis padres por enseñarme las cosas importantes de la vida y a ser como soy.

A todas las personas que han estado implicadas, de una forma u otra, en la elaboración de este trabajo y no están mencionadas.

De forma especial quiero agradecersele a Paco, por darme su apoyo cuando lo he necesitado, sus consejos, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, aguantar mis malos ratos, mis desahogos; en definitiva, por estar ahí.

Finalmente, a la Junta de Castilla y León la concesión de los proyectos SA076A07 y SA041A11-2 sin cuya subvención no hubieran podido realizarse las investigaciones efectuadas en este trabajo.

Muchas gracias a todos

ABREVIATURAS

2,4,5-T	Ácido triclorofenoxiacético
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
4-MN	4-metoxi- α -naphthol
AA	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
ACP	Fosfatasa ácida
ANA	Ácido naftalénico
ANOVA	Análisis de la varianza
B5	Medio Gamborg (1968)
BA	Benciladenina
BAP	Bencilaminopurina
BBi	Inhibidores tripsina / quimotripsina Bowman-Birk
CAT	Catalasa
DIC	Tratamiento controlado de caída de presión
DKW	Medio Driver y Kuniyuki (1984)
DNS	Dinitrosalicílico
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetracetato sódico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAA	Ácido indolacético
IBA	Ácido indolbutírico
ECM	Matriz extracelular
ESD	Embriogénesis somática directa
ESI	Embriogénesis somática indirecta
EST	Esterasa
FAD	Fibra ácido detergente
FAN	Factores antinutricionales
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y Agricultura.
FND	Fibra neutro-detergente
GA ₃	Ácido giberélico
GL	Grados de libertad
GOT	Transaminasa glutámico oxalacética
IEF	Isoelectroenfoque
IUPAC-IUB	International Union of Pure and Applied Chemistry e International Union Of Biochemistry And Molecular Biology
KIN	Kinetina
KTI	Inhibidor de tripsina Kunitz

LAD	Lignina
LTQ	Trampa lineal de iones
m/z	Masa /Carga
MA_nº	Diferentes Accesiones de <i>Medicago arborea</i>
MALDI	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
MCPA	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
MDH	Malato deshidrogenasa
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MSI	Medio MS suplementado con 2 mg l ⁻¹ de 2,4-D
MSII	MSI carente de citoquininas
MSIII	MS con 1,5% de sacarosa y suplementado con 5 µM ácido indolbutírico.
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSP	Polisacáridos no amiláceos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAL	L-fenilalanina amonio-liasa
PCD	Muerte celular programada
PEG	Poloetilenglicol
PEM	Masas proembriogénicas
PGRs	Reguladores del crecimiento en plantas
POD	Peroxidasa
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SBM	Harina de soja
SND	Contenido celular digerible
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TOF	Tiempo de vuelo
TZD	Tidiazuron
WPM	Medio Lloyd y McCown (1980)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I. CULTIVO DE TEJIDOS <i>IN VITRO</i> . EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	1
A. ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	2
A.1. Fases de la embriogénesis somática.	3
A.2. Características de los embriones somáticos.	21
A.3. Embriogénesis somática directa e indirecta.	21
A.4. Embriogénesis secundaria o recurrente y anomalías morfológicas.	23
B. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	24
B.1. Actividades enzimáticas.	25
B.2. Isoenzimas.	30
C. APLICACIONES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	32
II. VALOR NUTRITIVO DE LAS LEGUMINOSAS. IMPORTANCIA FORRAJERA.	37
A. FACTORES NUTRICIONALES.	39
A.1. Composición mineral.	39
A.2. Proteínas.	41
A.3. Carbohidratos y fibra.	43
A.4. Ácidos grasos.	45
B. FACTORES ANTINUTRICIONALES (FAN).	46
B.1. Inhibidores de proteasas: de tripsina y quimiotripsina.	47
B.2. Inhibidores de amilasas.	48
B.3. Lectinas.	50
B.4. Taninos.	51
B.5. Ácido fítico.	52
B.6. Oligosacáridos.	54
B.7. Saponinas.	56
B.8. Polisacáridos no amiláceos.	56
B.9. Alcaloides.	57
B.10. Glicósidos cianógenos.	58
B.11. Aminoácidos no proteicos.	59
III. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.	61

MATERIALES Y MÉTODOS

1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES.

- ¡Error! Marcador no definido.
- 1.1 Material vegetal. ¡Error! Marcador no definido.
- 1.2. Esterilización y germinación de semillas..... ¡Error! Marcador no definido.
- 1.3. Obtención de explantos..... ¡Error! Marcador no definido.
- 1.4. Condiciones y medios de cultivo..... ¡Error! Marcador no definido.
- 1.5 Germinación de embriones y obtención de plántulas..... ¡Error! Marcador no definido.
- 1.6. Estudios histológicos. ¡Error! Marcador no definido.

2. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA. ¡Error! Marcador no definido.

- 2.1. Extracción de Proteínas. ¡Error! Marcador no definido.
- 2.2 Cuantificación de proteínas totales. ¡Error! Marcador no definido.
- 2.3 Cuantificación de la actividad peroxidásica. ¡Error! Marcador no definido.
- 2.4. Análisis electroforético de isoenzimas. ¡Error! Marcador no definido.
 - 2.4.1.-Sistema Peroxidasa..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 2.4.2.- Sistema Esterasas..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 2.4.3.- Sistema Fosfatasa Ácida (ACP). ¡Error! Marcador no definido.
 - 2.4.4. Identificación de peroxidasas..... ¡Error! Marcador no definido.
 - 2.4.5.-Isoelectroenfoque (IEF) y tinción de peroxidasa. ¡Error! Marcador no definido.

3. ESTUDIO DE LOS VALORES NUTRICIONALES Y ANTINUTRICIONALES DE

DISTINTAS VARIETADES DE *Medicago arborea* L..... ¡Error! Marcador no definido.

- 3.1 Material vegetal. ¡Error! Marcador no definido.
- 3.2. Contenido de iones. ¡Error! Marcador no definido.
- 3.6. Contenido de proteínas. ¡Error! Marcador no definido.
- 3.4 Contenido de Fibra..... ¡Error! Marcador no definido.
- 3.5. Fitato..... ¡Error! Marcador no definido.
- 3.6. Inhibidores de α -amilasa. ¡Error! Marcador no definido.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ¡Error! Marcador no definido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>Medicago arborea</i> L. INDICADORES DE LA EMBRIOGÉNESIS.	¡Error! Marcador no definido.
A. ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	¡Error! Marcador no definido.
B. INDICADORES DE LA EMBRIOGÉNESIS.	¡Error! Marcador no definido.
II. ANÁLISIS NUTRITIVOS DE DISTINTAS ACCESIONES DE <i>Medicago arborea</i> . SELECCIÓN DE PLANTAS FORRAJERAS.	¡Error! Marcador no definido.
A. FACTORES NUTRICIONALES.	¡Error! Marcador no definido.
A.1. Composición de iones.	¡Error! Marcador no definido.
A.2. Fibra.	¡Error! Marcador no definido.
A.3. Nitrógeno y proteínas.	¡Error! Marcador no definido.
B. FACTORES ANTINUTRICIONALES.	¡Error! Marcador no definido.
B.1. La fitina.	¡Error! Marcador no definido.
B.2. Inhibidores de α -amilasa.	¡Error! Marcador no definido.
 DISCUSIÓN GENERAL.	¡Error! Marcador no definido.
 CONCLUSIONES.	2
 BIBLIOGRAFÍA.	6

INTRODUCCIÓN

I. CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Las técnicas de cultivo *in vitro* comenzaron a utilizarse a principios del siglo XX, cuando Haberlandt (1902) hizo crecer, en diferentes medios nutritivos, células y tejidos de plantas superiores. Introdujo así el principio de la totipotencia celular ya que predijo que si todas las células de un organismo vegetal tenían la misma información genética que la célula inicial, se podía producir una desdiferenciación y la adquisición, de nuevo, de la capacidad embriogénica: se podía, por lo tanto, regenerar plantas completas.

La posibilidad de regenerar plantas en virtud de la totipotencia celular, a partir de células de plantas seleccionadas, fue el elemento central de la biotecnología vegetal. Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos hicieron posible la regeneración de la mayor parte de las especies vegetales que presentaban interés económico. Ello abrió las puertas a la propagación vegetativa y, así mismo, a la clonación, mecanismo muy eficaz en la mejora vegetal.

Un cultivo *in vitro* consiste en la proliferación de células a partir de un fragmento vegetal llamado explanto que, colocado en un medio nutritivo adecuado y bajo las condiciones apropiadas, dará lugar a una masa desorganizada de células indiferenciadas llamada callo. El callo, una vez organizado, puede originar órganos (organogénesis) (Medina y cols., 1998;

Prakash y cols., 1999; Schween y Schwenkel, 2002; Singh y cols., 2003; Ganesh Kumari y cols., 2008) o embriones (embriogénesis somática) (Hita y cols., 1997; Gallego y cols., 2001; Wang y Bhalla, 2004; Capelo y cols., 2010)

La regeneración de plantas *in vitro* tiene lugar tanto vía embriogénesis somática como organogénesis. Un requisito previo para que las células diferenciadas conduzcan al desarrollo de embriones de “novo” o a la formación directa de órganos, es su reversión al estado de dediferenciación. Esta transición evolutiva requiere la reprogramación de la expresión génica (Yeung, 1995). Las células dediferenciadas que tienen un citoplasma denso y un núcleo prominente se conocen como células meristemoides (Thorpe, 1980) y el grado de dediferenciación en células meristemoides determina la dirección de la morfogénesis. Una dediferenciación completa conduce a la formación de embriones, mientras que una dediferenciación parcial da como resultado la inducción de órganos o el mantenimiento de células meristemoides (Thorpe, 1980).

A. ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Dentro del cultivo *in vitro* la regeneración a través de la embriogénesis somática ha sido el método más productivo en la formación de nuevas plantas sin la necesidad de que exista una fusión de gametos para originar un cigoto. La embriogénesis somática fue descrita inicialmente, en 1958, para *Daucus carota* (Reinert, 1958; Steward y cols., 1958). Desde entonces, los sistemas de embriogénesis somática se han desarrollado para una gran cantidad de especies vegetales (Mohanty y Ghost, 1988; Bajaj, 1995; Brown y cols., 1995; Mujib y Sama, 2006; Junaid y cols., 2007a,b; Moon y cols., 2008; Nasim y cols., 2009; Ghanti y cols., 2010).

Los estudios de microscopía han proporcionado descripciones detalladas de las características morfológicas y de los cambios anatómicos que caracterizan el desarrollo embrionario (Raghavan, 1986; Jayasankar y cols., 2003) pero, a pesar de todo, aun se conoce muy poco sobre los procesos que ocurren durante la progresión de células somáticas a células embrionarias.

A.1. Fases de la embriogénesis somática.

En la embriogénesis somática se pueden distinguir cuatro etapas: inducción, proliferación, maduración y germinación (Egertsdotter, 1999; Yang y Zhang, 2007; Chitra Devi y Narmathabai, 2011).

Durante la fase de inducción, las células somáticas diferenciadas adquieren la competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas.

En las fases de proliferación, maduración y regeneración, las células embriogénicas muestran su competencia embriogénica y se diferencian para formar embriones somáticos (Jiménez, 2001).

Con el fin de regular eficazmente el proceso de desarrollo de la regeneración de plantas, a partir de células somáticas y a través de embriogénesis somática, es importante entender lo que ocurre durante estas fases.

A.1.1. Inducción de la embriogénesis.

El término “Células embriogénicas” se refiere a aquellas células que han completado su transición de un estado somático a uno en el que pueden producir embriones somáticos, reprogramando el ciclo celular con la ayuda de estímulos exógenos, tales como la aplicación de reguladores del crecimiento

(Komamine y cols., 1992; De Jong y cols., 1993). Las células que no han completado esta transición pero que solo necesitan la aplicación de estímulos exógenos para convertirse en embriogénicas se definen como “Células competentes” (Toonen y cols., 1994).

Aún no están claros los cambios a los que tienen que someterse las células somáticas con el fin de convertirse en células embriogénicas, capaces de formar un embrión en una etapa posterior del desarrollo.

Los estudios con cultivos de zanahoria y alfalfa indicaron que la polaridad celular (Dijak y cols., 1986; Smith y Krikorian, 1990a) y una primera división celular asimétrica (Bogre y cols., 1990; Komamine y cols., 1990) estaban implicadas en la iniciación de la embriogénesis somática. Los reguladores del crecimiento exógenos, probablemente modifiquen la polaridad celular al interferir con gradientes de pH o campos eléctricos alrededor de las células (Dijak y cols., 1986; Smith y Krikorian, 1990a). Sin embargo, el sistema de seguimiento celular desarrollado por Toonen y cols. (1994) demostró que las células embriogénicas de zanahoria eran capaces de formar embriones somáticos después de una división simétrica o asimétrica. Esto implica que el plano correcto de división no es necesario para la embriogénesis somática. Sin embargo, la distribución asimétrica de las moléculas intracelulares o de los componentes celulares si tiene relación con el diferente destino de las células (Vroemen y cols., 1999).

En términos generales, el inicio de la embriogénesis somática implica que las células del explanto cambien su patrón de expresión y generen embriones somáticos. La iniciación de la vía embriogénica está restringida a la respuesta de ciertas células que pueden activar los genes implicados en la generación de células embriogénicas (Nomura y Komamine, 1985; Quiroz-Figueroa y cols., 2002). Una vez que estos genes se activan, un programa de

expresión génica embriogénica reemplaza al establecido en los procesos de expresión génica de los tejidos del explanto (Quiroz-Figueroa y cols., 2006). Los factores físicos y químicos que determinan la vía embriogénica de desarrollo son un paso clave en la inducción de la embriogénesis somática. Se ha propuesto que los reguladores del crecimiento en plantas (PGRs), y el estrés, desempeñan un papel central en la señal que conduce a la reprogramación de la expresión génica, seguido de una serie de divisiones celulares que inducen tanto al crecimiento desorganizado que produce callos como al crecimiento polarizado que conduce a la embriogénesis somática (Dudits y cols., 1991; De Jong y cols., 1993).

A.1.1.1. Características de las células embriogénicas.

Las células embriogénicas, a partir de las cuales se originan los embriones, se caracterizan por ser de pequeño tamaño, por poseer un citoplasma denso con un núcleo grande, vacuolas pequeñas, muchos ribosomas y altas concentraciones de ARN, proteínas y abundantes granos de almidón (Megia y cols., 1993; Dutta-Gupta y Conger, 1999). Estas células, además, se suelen disponer en la periferia de las masas proembriogénicas (Marapara y cols., 1999; Bozhkov y cols., 2002). Su histoquímica y ultraestructura sugieren una intensa actividad metabólica y una gran síntesis de ARN (Williams y Maheswaran, 1986). Otra característica de las células embriogénicas es el grosor de su pared celular: este engrosamiento proporciona un relativo aislamiento que garantiza la expresión de su totipotencia, de tal forma que dentro de esas paredes se realizan divisiones por segmentación interna. Se forman, así, grupos discretos de células, de dos a ocho, separados del resto por una pared celular gruesa. Las divisiones continuadas de dichos grupos celulares originan estructuras alargadas con una organización bipolar: los proembriones, que posteriormente se desarrollarán hasta la formación de embriones. Como muchos de los proembriones iniciados

degeneran o interrumpen su desarrollo, su número suele ser mayor que el de los embriones somáticos formados a partir de ellos (Anbazhagan y Ganapathi, 1999; Fernandez y cols., 1999; Yu y cols., 2000).

Junto a las anteriores células embriogénicas, existen otras células alargadas, muy vacuoladas (una gran vacuola ocupa la mayor parte de su volumen) y carentes de potencial embriogénico que, aunque no participen directamente en el proceso embriogénico, parece ser que lo sinergizan (Chasan, 1992), es decir, su presencia es necesaria para que se produzca la embriogénesis.

Entre estos dos tipos de células (vacuoladas y embriogénicas), existe una continuidad citoplasmática a través de plasmodesmos (Sasaki y cols., 1994; Samaj y cols., 1999). Posteriormente, durante el desarrollo de los embriones somáticos, esta conexión plasmodésmica se pierde (Kiyosue y cols., 1992), lo que indica un aislamiento con el tejido que rodea a las células embriogénicas (Fransz y Schel, 1991).

Otra característica importante para la adquisición de la competencia embriogénica consiste en el aislamiento físico de la célula de otras, como puede ser la ausencia de contacto a través de plasmodesmos con las células vecinas en cultivos embriogénicos de maíz (Fransz y Schel, 1991), y el depósito de callosa en la pared de las células embriogénicas de *Trifolium* (Maheswaran y Williams, 1985), *Cichorium* (Dubois y cols., 1990) y coco (Verdeil y cols., 2001). Más recientemente, una característica ultraestructural única designada la matriz extracelular (ECM) fue observada en *Brassica napus* durante la adquisición de competencia embriogénica (Namasivayam y cols., 2006). ECM parece estar presente en la superficie de tejidos embriogénicos, pero no en los no-embriogénicos. Se encontró que la capa de ECM era dominante en la etapa de pre-embriogénesis y estaba reducida a fragmentos

durante el crecimiento embrionario y el desarrollo del tejido embriogénico maduro. Estos estudios sugirieron que el aislamiento puede ser necesario para permitir la inducción de nuevos hechos morfogénicos y para evitar las interferencias de los tejidos adyacentes que están degenerando (Maheswaran y Williams, 1985). Curiosamente el cigoto también se desarrolla en aislamiento citoplásmico.

Un estudio sobre el seguimiento de la embriogénesis somática en *D. glomerata* con un adicional gen marcador de embriogénesis somática, receptor de tipo quinasa (SERK), demostró que las células que dan lugar a una alta embriogénesis somática directa eran células aisladas, pequeñas, isodiamétricas y con un citoplasma denso, originándose siempre los embriones cerca de los haces vasculares (Somleva y cols., 2000).

A.1.1.2. Factores que influyen en la adquisición de la capacidad embriogénica.

El proceso de embriogénesis somática está directamente regulado por una gran cantidad de factores que se usan para inducir embriones somáticos.

- **Reguladores del crecimiento.**

Los reguladores del crecimiento vegetal (PGRs) están considerados como los factores más importantes en el desarrollo de la embriogénesis bajo condiciones *in vitro* (Feher y cols., 2003). Los reguladores del crecimiento juegan un papel vital (Koh y Loh, 2000; Nuutila y cols., 2002; Van Winkle y cols., 2003; Cheong y Pooler, 2004; Pullman y cols., 2005; Junaid y cols., 2006, 2008; Feng y cols., 2009; Nasim y cols., 2010) y el equilibrio correcto o la proporción correcta de estos compuestos ejerce, con frecuencia, un papel fundamental en la optimización del desarrollo de embriones somáticos *in vitro*

(Ochatt y cols., 2000; Moon y cols., 2008; Ghanti y cols., 2010; Chitra Devi y Narmathabai, 2011).

Las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscisico y etileno son hormonas vegetales de origen natural. Entre estas hormonas, las auxinas y citoquininas son las más empleadas en este tipo de estudios.

La activación de la respuesta por auxinas puede ser un acontecimiento clave en la adaptación celular y en la reprogramación genética, metabólica y fisiológica, que conduce a la competencia embriogénica de las células somáticas.

En la mayoría de las plantas, el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ha demostrado ser la auxina más potente y efectiva para la inducción de la embriogénesis somática (Chen y cols., 2010; Konieczny y cols., 2010; Prange y cols., 2010; Ratanasanobon y Seaton 2010; Yang y cols., 2010; Zhang y cols., 2010; Chai y cols., 2011; Chitra Devi y Narmathabai 2011; Dai y cols., 2011) aunque se ha observado que la utilización de altas concentraciones de esta auxina puede reducir la inducción de la embriogénesis somática en callos (Wang y Bhalla, 2004) y disminuir la frecuencia y número de embriones originados (Sivanesan y cols., 2011).

El empleo del ácido naftalénico (ANA), como auxina, para la inducción de la embriogénesis somática en *Lithospermum erythrorhizon* (Yu y cols., 1997) y en garbanzo (Ghanti y cols., 2010) produjo mejores resultados que el 2,4-D. También se ha utilizado esta auxina en algunas especies del género *Medicago* (Nolan y cols., 1989; Scarpa y cols., 1993; Ibragimova y Smolenskaya, 1997), en *Desmodium motorium* (Chitra Devi y Narmathabai, 2011) y en cultivos de mandioca donde se indujo una mayor embriogénesis somática que con 2,4-D (Sofiari y cols., 1997).

El uso de una auxina natural como el ácido indolacético (IAA) no suele ser muy común en los medios de cultivo para inducir la embriogénesis somática aunque su aplicación ha conseguido buenos resultados en *Desmonium motorium* (Chitra Devi y Narmathabai, 2011).

Hay algunos casos en los que se necesita la aplicación del ácido indolbutírico (IBA) como auxina. Raemarkers y cols. (1995) demostraron el éxito en la inducción de la embriogénesis somática con IBA frente a otras auxinas, utilizando 65 especies de dicotiledóneas. El IBA también indujo la embriogénesis somática en algarrobo (Canhoto y cols., 2006), *Jatropha curcas* (Jha y cols., 2007), algodón (Sun y cols., 2009) y *Aralia elata* (Dai y cols., 2011).

Otras auxinas sintéticas que se emplean en los cultivos *in vitro* son el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) cuya adición al medio en guisante fue tan eficaz en la inducción de la embriogénesis somática como el 2,4-D (Kysely y Jacobsen, 1990; Louiseau y cols., 1995; Werbrouck y cols., 1998). En garbanzo (Ghanti y cols., 2010), el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) y el ácido triclorofenoxiacético (2,4,5-T), fueron también eficaces.

Aunque la auxina sea el inductor principal de la embriogénesis somática (Feher y cols., 2003) e incluso en algunas especies se pueda lograr la inducción sólo con auxina (Jeya Mary y Jayabalan, 1997; Nasim y cols., 2010), por lo general los mejores resultados se obtienen cuando se añaden al medio de cultivo además de auxinas, citoquininas (Zhou y cols., 1994; Martín y cols., 2000; Gallego y cols., 2001; Wu y cols., 2004; Nasim y cols., 2010). Aunque se ha encontrado que la citoquinina natural, zeatina, tiene efectos positivos en la inducción (Gomes da Cunha y Fernandes Ferreira, 1996; Hita y cols., 1997), la citoquinina sintética kinetina, es una de las más empleadas (Martín y cols., 2000; Seetharama y cols., 2000; Gallego y cols., 2001; Ghanti y cols., 2010).

Otras citoquininas como la benciladenina (BA), bencilaminopurina (BAP) y 2iP solas o en combinación con otras citoquininas y/o auxinas también han sido utilizadas para inducir la embriogénesis somática en muchas especies (Wang y Bhalla, 2004; Wu y cols., 2004; Canhoto y cols., 2006; Agrawal y Sardar, 2007; Ganthi y cols., 2010; Menéndez-Yuffá y cols., 2010; Nasim y cols., 2010; Prado y cols., 2010a; Zdravković-Korać y cols., 2010; Kong y von Aderkas, 2011; Rodríguez-Sahagún y cols., 2011).

En legumbres es relativamente raro que se produzca inducción de embriogénesis somática sólo en presencia de citoquininas (Maheswaran y Williams, 1985; Malik y Saxena, 1992). Utilizando *Medicago* casi todas las investigaciones realizadas confirman la inducción de la embriogénesis somática en medios suplementados solo con una auxina (2,4-D/ANA) o en combinación de la auxina con citoquininas (Orczyk, 1992; Hita y cols., 1997, 2003; Lou y cols., 1999; Martín y cols., 2000; Iantcheva y cols., 2005; Canhoto y cols., 2006; Agrawal y Sardar, 2007).

El tidiazuron (TDZ) tiene una actividad similar a las citoquininas y en algunos casos puede provocar una respuesta mejor que la de las citoquininas clásicas (Werbrouck y cols., 1998). También, en otros casos, el TDZ no tiene un efecto significativo en la inducción de la embriogénesis somática (Cheng y Chang, 2000; Wu y cols., 2004)

Las giberelinas, especialmente el ácido giberélico (GA₃), no son tan eficaces como las auxinas y las citoquininas en la inducción. Se ha comprobado que en *Allium sativum* su adición al medio favorece la maduración y aumenta la calidad de los embriones somáticos (Nasim y cols., 2010). Generalmente, las giberelinas participan en el proceso de germinación de los embriones (Cangahuala-Inocente y cols., 2007; Peña-Ramírez y cols., 2011; Siddiqui y cols., 2011; Sivanesan y cols., 2011).

El ácido abscísico (ABA) juega un papel muy importante en la regulación de muchos procesos fisiológicos de plantas. Con frecuencia, en los cultivos de tejidos promueve la embriogénesis somática y aumenta la calidad de los embriones somáticos ya que aumenta la tolerancia a la desecación y previene la germinación precoz (Rai y cols., 2011).

El etileno, como regulador del crecimiento, ha sido poco estudiado. La mayoría de los resultados demuestran que el etileno, que normalmente es producido por la mayoría de los cultivos *in vitro*, tiene un efecto negativo en la inducción de la embriogénesis (Razdan, 1993).

Recientemente, la aplicación de una nueva generación de reguladores del crecimiento, tales como oligosacáridos, jasmonatos, poliaminas, y brasinoesteroides, esteroides, fosfoinosítidos y ácido salicílico, ha demostrado que también son útiles para el inicio de la embriogénesis somática (Gaspar y cols., 1996; Jiménez, 2005).

- **Genotipo.**

El genotipo es el factor clave que afecta a la embriogénesis somática vegetal. La frecuencia de embriogénesis somática ha demostrado ser muy diversa a causa de la variación genotípica, incluso dentro del mismo género. No todas las especies de un mismo género pueden ser inducidas para producir embriogénesis somática; incluso, dentro de la misma especie, pueden existir variaciones dependiendo de accesión objeto de estudio. Tang y cols. (2000) indicaron que la variedad Yesanhan es un genotipo ideal para inducir la embriogénesis somática en pepino. Diferentes variedades tempranas de nueces (Xiangling y Yuanfeng) tienen frecuencias diferentes de inducción de embriones somáticos cuando se utilizan los mismos explantos (Yang y cols., 2003). En nogal solamente se han encontrado 5 especies y 3 híbridos que inducen la embriogénesis somática con éxito, dependiendo de genotipos y

explantos (Ashok y cols., 2003). Kielly y Bowley (1992) y Bian y cols. (2007) demostraron que los distintos genotipos de ciclamen (*Cyclamen persicum*) y alfalfa (*Medicago sativa*), respectivamente, juegan un papel muy importante en la inducción de la embriogénesis somática.

- **Tipo de explanto.**

La inducción de la embriogénesis somática también está influenciada por el tipo de explanto utilizado (Capelo y cols., 2010; Chitra Devi y Narmathabai, 2011). En general, el tejido con un metabolismo más alto, y con un nivel de diferenciación más bajo, puede promover la inducción de la embriogénesis somática (Bian y cols., 2007).

Se puede generalizar que los explantos suelen mostrar una polaridad marcada en la morfogénesis (Chung y cols., 2007). Esto puede estar relacionado con la posición del órgano o fragmento del tejido en la planta intacta. Por ejemplo, en Lowbush blueberry, la callogénesis y la organogénesis eran más abundantes en los segmentos basal y medio de las hojas que en los apicales (Debnath, 2009); los ápices de brotes de *Clematis florida* Thunb tienen mejor capacidad de inducir embriogénesis somática que las hojas, y tallos jóvenes (Niu y cols., 2006). Xin y cols. (2006) indicaron que en *Anthurium andraeanum* es mucho más fácil inducir la embriogénesis en hojas que en otros explantos al igual que ocurre en la caña de azúcar (Lakshmanan y cols., 2006). Esta diferente capacidad puede depender del equilibrio entre PGRs exógenos y endógenos (Tang y cols., 2002), y en particular de los niveles de auxinas endógenas (Feher y cols., 2003).

Así, seleccionar el distinto explanto es un factor clave para inducir la embriogénesis somática.

- **Composición del medio basal.**

Los componentes del medio basal juegan un papel complejo en la embriogénesis somática. Son cinco los principales medios con los que se logra la embriogénesis: MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), B5 (Gamborg y cols., 1968), DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) y WPM (Lloyd y McCown, 1980). En la mayor parte de los cultivos realizados, el medio MS es el considerado más eficaz. Hay autores (Dewald y Wang, 1989) que señalaron el medio B5 como más eficaz que el MS o el medio WPM el principal inductor para la embriogénesis somática de mango. El medio DKW, no tan conocido, es el mejor medio para inducir embriogénesis somática con la nuez, pero los efectos del WPM fueron mucho mejores que los del DKW para obtener embriogénesis somática utilizando el nogal negro. En las mismas condiciones, la frecuencia de la embriogénesis somática de embriones jóvenes de nuez en medio MS fue mayor que en el DKW pero, sin embargo, la frecuencia embriogénica cuando se utilizaron los cotiledones como explanto en el medio DKW fue mayor que en MS (Tang y cols., 2000). En resumen, la embriogénesis somática requiere de medios diferentes en función de los genotipos, los explantos, y las especies vegetales.

- **Fuente de carbono.**

Utilizándola como fuente de carbono, así como agente osmótico en cultivos de tejidos, la sacarosa en el medio produjo una aceleración de la embriogénesis somática en pepino (Lou y Kako 1994, 1995), en ajo (Li y cols., 2002), en palmera datilera (Zouine y El Hadrami, 2004; Alkhateeb, 2006) y en *Aralia elata* Seem (Dai y cols., 2011); también se produjo embriogénesis secundaria en *Prunus incisiva* cv February Pink (Cheong y Pooler, 2004). El suministro de sacarosa en el medio de cultivo puede ser el responsable del

incremento del potencial osmótico del medio y la plasmólisis de las células puede estimular la división celular e incrementar la producción de embriones somáticos (González y cols., 2001). En *Abies nordmanniana*, se encontró que la maltosa era mejor fuente que la sacarosa en la formación de un número mayor de embriones somáticos y en el porcentaje de germinación de estos embriones; la mezcla de maltosa y sacarosa no produjo un resultado tan bueno como la maltosa pura (González y Jove, 2000). Samoylov y cols. (1998) indicaron que la sacarosa promovía una histodiferenciación y una maduración de los embriones mucho más rápida que la maltosa. De acuerdo con estos resultados, parece que la sacarosa, seguida por su hidrólisis a lo largo del periodo de maduración, puede ser un factor regulador para la síntesis de proteínas y azúcares de almacenamiento en embriones somáticos (Corredoira y cols., 2003). Estos autores indicaron que la sacarosa podría considerarse como un regulador de los genes de las proteínas y azúcares de almacenamiento, aumentando su expresión.

La adición al medio de otros carbohidratos como glucosa, maltosa, fructosa junto con la sacarosa, aumenta la maduración y la germinación de los embriones somáticos (Corredoira y cols., 2003; Junaid y cols., 2006; Nasim y cols., 2010).

La fuente de carbono parece tener un papel esencial tanto para el crecimiento *in vitro* como para el desarrollo, afectando tanto a la embriogénesis somática como a la maduración de los embriones.

- **Fuente de nitrógeno.**

El nitrógeno reducido es otro de los factores más importantes tanto en la inducción embriogénica como en el desarrollo embrionario. Sus efectos dependerán de la naturaleza y proporción de los compuestos nitrogenados suministrados. Para una óptima embriogénesis somática se requieren formas

de nitrógeno tanto reducidas como no reducidas (Higashi y cols., 1996). En general, el medio MS que contiene altas cantidades de NH_4NO_3 se utiliza siempre en la inducción de la embriogénesis somática. Se confirmó que una fuente adicional de nitrógeno reducido podía ser beneficioso para la desdiferenciación y proliferación de las células epidérmicas para así iniciar la formación de embriones secundarios en *Dactylis glomerata*, produciendo un menor número de anomalías en los embriones (Trigiano y cols., 1992). Igualmente el nitrógeno reducido aumentaba el número de embriones producidos en cultivos de alfalfa (Stuart y Strickland, 1984), zanahoria (Smith y Krikorian, 1992) y suspensiones de pepino (Burza y Malepszy, 1995) pero también podía ser perjudicial para el crecimiento y morfogénesis en muchas plantas. En calabaza, el crecimiento de tejidos embriogénicos en un medio inducido por NH_4^+ era lento, produciéndose una considerable acidificación del medio y el desarrollo de los embriones solamente tenía lugar cuando el medio se suplementaba con nitrato o L-glutamina (Mihaljevic y cols., 2011).

• Aminoácidos.

Diferentes aminoácidos tienen distintas funciones en la embriogénesis. Altas concentraciones de L-cisteína, L-glutamina y L-prolina añadidas al medio de cultivo inhibían la embriogénesis somáticas en *Prunus incisa* cv. February Pink (Cheong y Pooler, 2004), efecto contrario al observado con otras especies en que la adición de aminoácidos al medio de cultivo aumentaba la embriogénesis. La glutamina y caseína hidrolizada se usaron para promover la embriogénesis en manzanas y nectarinas (Raj Bhasali y cols., 1990) y eucalipto (Pinto y cols., 2002b), y L-prolina se ha demostrado que aumenta la embriogénesis somática en etapas tempranas de cultivos de rosas floribunda (Marchant y cols., 1996) y miscanthus (Holme y cols., 1997).

• **Condiciones de luz.**

Hay numerosas informaciones de que la luz no es necesaria para la embriogénesis y que incluso puede inhibirla (De March y cols., 1993; Machado y cols., 1995; Castillo y Smith, 1997; Kintzios y Taravira, 1997; Morini y cols., 2000). En *Prunus incisa* cv. February Pink (Cheong y Pooler, 2004) no encontraron diferencias significativas en las respuestas obtenidas con los dos tratamientos, aunque los explantos cultivados en oscuridad durante al menos tres semanas tendieron a producir más embriones somáticos que los crecidos en luz.

• **pH.**

Varios estudios han mostrado que los cambios en pH intracelular pueden también contribuir a la adquisición de la competencia embriogénica (Schaefer, 1985; Smith y Krikorian, 1990a,b). Por ejemplo, en células derivadas de protoplastos de hojas de alfalfa, la alcalinización citoplasmática y vacuolar y la acidificación del medio mostró una correlación con la activación de la división celular (Pasternak y cols., 2002). También se informó de que células embriogénicas, con citoplasma denso, tenían una tendencia a mostrar altos valores de pH vacuolar en comparación con las células no embriogénicas vacuoladas.

A.1.2. Proliferación de los embriones somáticos.

Una vez que las células embriogénicas se han formado, continúan proliferando y forman masas proembriogénicas (PEM). La auxina es necesaria para la proliferación de PEM pero es inhibidora del desarrollo de los embriones somáticos (Nomura y Komamine, 1985; Filonova y cols., 2000). En muchos sistemas embriogénicos, la transferencia de los embriones somáticos a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento aumenta el desarrollo de

embriones somáticos y su conversión en plantas. Uno de los factores que probablemente determine la baja tasa de conversión a plántulas se asocia con los efectos residuales de 2,4-D (Cangahuala-Inocente y cols., 2007; Konieczny y cols., 2010)

El grado de diferenciación de los embriones, que tiene lugar en presencia de auxina, varía en las diferentes especies. Cultivos embriogénicos de algunas especies, y algunos genotipos, se subcultivaron durante un periodo prolongado en un medio que contenía PGRs y todavía conservaban su potencial embriogénico completo. Sin embargo, en la mayoría de los cultivos, el potencial embriogénico disminuía con el cultivo prolongado y se perdía con el tiempo (Van Arnold y cols., 2002).

En general, un embrión somático o embriode puede surgir de una sola célula (Haccius, 1978), o de un grupo de células (Raghavan, 1976). El origen de los embriones somáticos, a partir de una o de varias células, está directamente relacionado con el comportamiento coordinado de las células vecinas. Cuando los embriones tienen un origen unicelular, se producen divisiones coordinadas de células y el embrión está a veces conectado al tejido materno por una estructura tipo suspensor (Williams y Maheswaran, 1986). Sin embargo, en la formación de embriones con un origen multicelular, se observa inicialmente una protuberancia que carece de divisiones celulares coordinadas y los embriones en la zona basal están fusionados al tejido materno (Quiroz-Figueroa y cols., 2006) (Fig. 1). Los estudios histológicos en las diferentes especies han descrito vías tanto unicelulares (Trigiano y cols., 1989; Rojas-Herrera y cols., 2002) como pluricelulares (Taylor y Vasil, 1996; Fernández y cols., 1999). Incluso en la misma especie vegetal, se pueden observar ambas vías de desarrollo durante la embriogénesis somática indirecta (Fernández y cols., 1999) o la embriogénesis somática directa (Maheswaran y Williams, 1985; Trigiano y cols., 1989).

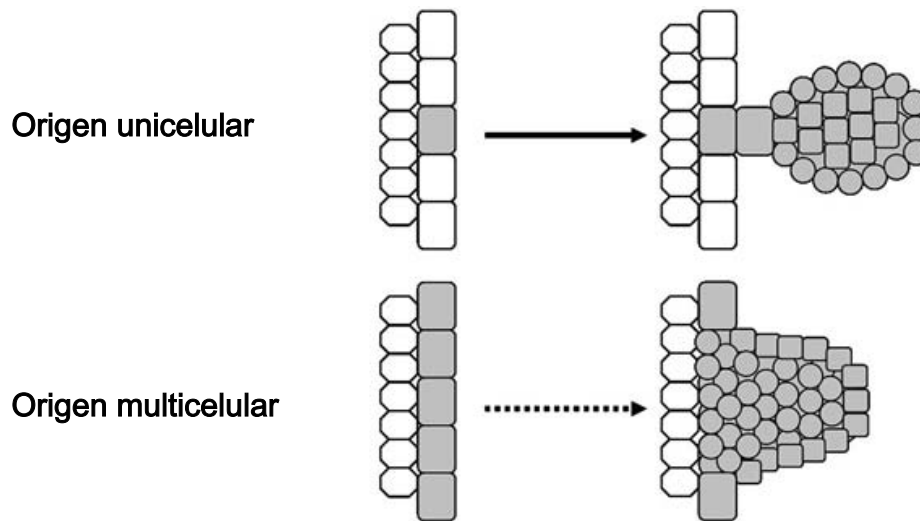


Figura 1. Representación esquemática del origen unicelular y multicelular de los embriones somáticos (dibujo tomado de Quiroz-Figueroa y cols., 2006).

Otra cuestión de debate es la situación de las células a partir de las cuales se forman los embriones somáticos, células superficiales/epidermis o células subepidérmicas. Cuando el embrión somático se origina a partir de una célula superficial, posiblemente su origen sea unicelular, y su formación a partir de células subepidérmicas representaría un origen multicelular (Maheswaran y Williams, 1985). En general, se acepta que en la vida los embriones somáticos se originan de células aisladas de la epidermis o de células subepidérmicas (Gray, 1995; Jayasankar y cols., 2003).

El desarrollo del embrión somático *in vitro*, independientemente de cuál sea su origen, consta de varias fases embrionarias similares a las de un embrión cigótico derivado de la fusión de gametos.

El desarrollo del embrión cigótico se puede dividir en dos etapas: una primera morfogénica, en la que se establece la estructura básica del embrión, y una segunda metabólica, caracterizada por las actividades bioquímicas que

preparan al embrión para la quiescencia (Lopes y Larkins, 1993; Harada, 1999). Además, durante la fase de morfogénesis, el desarrollo del embrión cigótico se puede dividir en las siguientes etapas: globular, corazón, torpedo y cotiledonar en dicotiledóneas, globular, escutelar y coleoptilar en monocotiledóneas y globular, cotiledonar temprana y tardía en coníferas (Zimmerman, 1993; Quiroz-Figueroa y cols., 2006). Al igual que el embrión cigótico, los embriones somáticos también pasan por estas etapas morfológicas. Los PEM se organizan en un embrión globular típico que después progresa a corazón y torpedo. En la etapa cotiledonar, en lugar de entrar en una fase de interrupción del desarrollo y quiescencia como ocurre en el embrión cigótico (Bewley y Black, 1994), los embriones somáticos inician un brote meristemático y el crecimiento en plántulas. A diferencia de sus homólogos cigóticos, los embriones somáticos no presentan tejidos de almacenamiento cuya función, en los cigóticos, es la nutrición, protección y regulación del intercambio gaseoso (Gray y Purohit, 1991; Barry-Etienne y cols., 2002), son fácilmente manejables, las condiciones de cultivo pueden ser controladas, y la falta de material no es un factor limitante para la experimentación (Kawahara y Komamine, 1995; Quiroz-Figueroa y cols., 2006).

A.1.3. Maduración y germinación de embriones.

El paso más crítico en la embriogénesis somática, así como en la formación de semillas sintéticas, es el proceso de maduración, específicamente en la capacidad de los embriones para germinar y producir plántulas (Ara y cols., 2000). Se han realizado numerosos estudios para ver cuáles podían ser los métodos más efectivos en la maduración de embriones somáticos y los tratamientos que han tenido éxito incluyen la adición de reguladores osmóticos (Ramarosandratana y cols., 2001), el uso de inhibidores de etileno (Mandal y cols., 2001), suplementos de ABA (Torres y cols., 2001; Othmani y cols., 2009),

estrés por falta temporal de nutrientes (Lee y cols., 2001) y desecación (Gorbatenko y Hakman, 2001).

El ABA se ha utilizado en cultivos de tejidos para promover la maduración de los embriones somáticos y la síntesis de las reservas de almacenamiento en los embriones durante la maduración (Dodeman y cols., 1997; Chugh y Khurana, 2002; Van Arnold y cols., 2002). El ABA también actúa como un factor de control de la germinación y latencia en los embriones somáticos (Ara y cols., 1999) y se utiliza, generalmente, para inducir la quiescencia durante el cultivo de tejidos vegetales y los estudios de semillas sintéticas (Zimmermann, 1993; Rai y cols., 2008). El ABA, además, se puede utilizar como un anti-transpirante durante la aclimatación de cultivos de tejidos (Pospisilova y cols., 1999).

La aplicación de ABA como factor de estrés tuvo un efecto positivo tanto en embriogénesis somática primaria como secundaria en zanahoria (Kiyouse y cols., 1992; Nishiwaki y cols., 2000; Ogata y cols., 2005) pero mostró un efecto negativo en *Aralia elata* (Dai y cols., 2011)

La inclusión de carbón activo al medio se ha comprobado que es ventajoso para el crecimiento y el desarrollo normal del embrión en varias especies de plantas (Thomas, 2008; Dhekney y cols., 2011). El efecto beneficioso de carbón activo en la germinación de embriones somáticos se da, probablemente, por la adsorción de los reguladores del crecimiento, especialmente de las auxinas (Von Aderkas y cols., 2002). La adición de GA₃ al medio aumentaba significativamente la germinación de embriones (Sivanesan y cols., 2011). El papel de GA₃ en la germinación de embriones somáticos se ha estudiado en muchas plantas como *Acca sellowiana* (Cangahuala-Inocente y cols., 2007), *Cedrela odorata* (Peña-Ramírez y cols., 2011) y *Catharanthus roseus* (Siddiqui y cols., 2011).

A.2. Características de los embriones somáticos.

Inicialmente los embriones son estructuras bipolares que al principio están unidos débilmente al explanto (Yeung, 1995; Benelli y cols., 2001). Tal polaridad no es evidente en la formación de los órganos por organogénesis, y así estos órganos se mantienen unidos a los tejidos de origen (Tisserat, 1985).

Exámenes histológicos mostraron que en la embriogénesis somática de *Scaveola aemula*, los embriones globulares crecieron de las capas internas de los explantos de hojas y es posible que los embriones somáticos derivaran del mesófilo de las hojas. Estos embriones somáticos no estaban conectados con los tejidos parentales (Wang y Bhalla, 2004).

En *Quercus suber* (Pinto y cols. 2002a), *Eucalyptus globulus* (Pinto y cols. 2002b), *Ulmus minor* (Conde y cols., 2004) y olivo (Capelo y cols., 2010), los embriones globulares poseían unas células centrales relativamente vacuoladas mientras que en el exterior las células mostraron una alta actividad mitótica con frecuentes divisiones periclinales. También se observó una diferenciación vascular en algunos de estos embriones globulares. Además, los análisis histológicos confirmaron la presencia repetitiva de la embriogénesis somática, de forma similar a lo que se había informado anteriormente para el cultivo de olivo “Canino” con material juvenil (Benelli y cols., 2001).

A.3. Embriogénesis somática directa e indirecta.

Los embriones somáticos pueden diferenciarse directamente desde el explanto, sin una fase intermedia de callo, que es lo que se llama embriogénesis somática directa (ESD), o indirectamente, después de una fase

de callo (ESI) (Sharp y cols., 1980). Se cree que ambos procesos son extremos de una vía de desarrollo continuo (Carman, 1990).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, las células proembriogénicas competentes ya están presentes en la ESD y sólo es necesaria una mínima proliferación o la reprogramación del tejido desorganizado para la formación de los embriones. Sin embargo, en el ESI se necesita una gran reprogramación para obtener callos con capacidad embriogénica antes de la formación del embrión (Williams y Maheswaran, 1986; Yeung, 1995).

Los principales factores implicados en cada caso dependen de la fuente y del estado fisiológico del explanto empleado y del tipo y concentración de PGRs. Los explantos donde más probablemente se da una ESD son microsporas (microsporogénesis), óvulos, embriones cigóticos y somáticos inmaduros, y plántulas (Germana, 2003; Malik y cols., 2007). La embriogénesis indirecta es la que se ha estudiado más ampliamente (Aydin y cols., 2004; Rout y cols., 2006; Thorpe, 2007; Seguí-Simarro y Nuez, 2007) y se ha utilizado en la transformación e hibridación somática (Jin y cols., 2005; Li y cols., 2006; Yang y cols., 2007).

Durante la embriogénesis indirecta, existen tanto callos embriogénicos como no embriogénicos. Por lo general, es fácil distinguir entre ambos tipos de callos por su morfología y su color. Los callos embriogénicos presentan características nodulares, son compactos, con una superficie lisa y un crecimiento lento, estando las células embriogénicas que forman los embriones somáticos caracterizadas por ser pequeñas e isodiamétricas. Estas células tienen un gran núcleo y un citoplasma denso, poseen pequeñas vacuolas, gruesas paredes celulares y una alta actividad metabólica. Los callos no embriogénicos son rugosos, friables y translúcidos, con células irregulares que

poseen grandes vacuolas (Jiménez y Bangerth, 2001; Chitra Devi y Narmathadi, 2011).

A.4. Embriogénesis secundaria o recurrente y anomalías morfológicas.

En muchas ocasiones, a partir de los embriones somáticos maduros se pueden formar nuevos embriones somáticos a partir de células epidérmicas. A este fenómeno se le conoce como embriogénesis secundaria y ha sido estudiada en una gran variedad de plantas como en *Prunus avium* (Garin y cols., 1997), *Helianthus maximiliani* (Vasic y cols., 2001), *Glycine max* (Fernando y cols., 2002), *Catharanthus roseus* (Iantcheva y cols., 2005), *Ceratonia siliqua* (Canhoto y cols., 2006), *Dyanthus caryophyllus* (Karami y cols., 2008), *Cinnamomum camphora* (Shi y cols., 2010), *Desmodium motorium* (Chitra Devi y Narmathadi, 2011).

A veces, los embriones somáticos presentan anomalías morfológicas como la aparición de un solo cotiledón, un número extra de cotiledones, cotiledones fusionados o cotiledones con forma de trompeta. Entre otras especies, se han encontrado estas anomalías en *Glycine max* (Korbes y Droste, 2005; Santos y cols., 2006; Hiraga y cols., 2007), *Astragalus adsurgens* (Lou y cols., 1999), *Dalbergia latifolia* (Sita y Rao, 2005), *Ceratonia siliqua* (Canhoto y cols., 2006) y *Cassia angustifolia* (Agrawal y Sardar, 2007), *Desmonium motorium* (Chitra y Narmathadi, 2011) y *Cyphomandra betacea* (Correia y cols., 2012). Estas anomalías interfieren en el posterior desarrollo del embrión somático a planta y parece que se deben a las condiciones de cultivo, al desequilibrio de nutrientes o a los factores de crecimiento (Guevin y Kirby, 1997) y que no son una consecuencia de factores intrínsecos de los embriones somáticos ya que embriones cigóticos extraídos de las semillas y cultivados *in*

vitro presentaban las mismas anomalías (Gray y Purohit, 1991). Las anomalías morfológicas observadas, como los embriones multicotiledonares o la forma en abanico de los cotiledones, podrían estar relacionadas con trastornos en el transporte polar de auxinas (Liu y cols., 1993).

B. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Como se ha mencionado anteriormente, en un cultivo *in vitro* se diferencian dos tipos de callos, embriogénicos y no embriogénicos. Los callos embriogénicos crecen rápidamente, poseen células pequeñas e isodiamétricas y forman plantas vía embriogénesis somática, mientras que los callos no embriogénicos crecen lentamente, de manera desorganizada, poseen células irregulares, altamente vacuoladas y forman, o no, raíces o brotes vía organogénesis (Rao y cols., 1990; Jiménez y Bangerth, 2001; Chitra Devi y Narmathadi, 2011). En muchos casos, el potencial embriogénico es identificado por las anteriores características morfológicas pero, sin embargo, esta apreciación visual es subjetiva y, con frecuencia, sólo aplicable después de períodos prolongados de cultivo. Una identificación bioquímica temprana del potencial embriogénico sería de gran ayuda para conseguir una eficaz regeneración de plantas y para superar algunas de las dificultades surgidas, como puede ser la respuesta embriogénica dependiendo del genotipo.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto un mayor interés en la identificación de marcadores bioquímicos o moleculares del potencial embriogénico en el cultivo de tejidos vegetales, es decir, marcadores que se expresen antes de cualquier cambio morfológico (Chibbar y cols., 1988; Franz y cols., 1989; Pedersen y Andersen, 1993; Tchorbadjieva y Odjakova, 2001;

Nieves y cols., 2003; Balen y cols., 2009). Estos marcadores servirían como una buena herramienta para realizar un sencillo seguimiento del estado embriogénico en cualquier tipo de investigación.

Estos marcadores bioquímicos o moleculares del potencial embriogénico se han identificado en varias especies de plantas. Así se han descrito en zanahoria dos proteínas específicas de embriones (Sung y Okimoto, 1981), una secuencia de ADNc (Wilde y cols., 1988) e incluso una baja producción de etileno (Feirer y Simon, 1991); en guisante se han señalado dos proteínas específicas de embriones (Stirn y Jacobsen, 1987); en coníferas se han descrito patrones de polipéptidos (Chen y Luthe 1987; Stirn y Jacobsen 1987), baja producción de etileno, una alta tasa de síntesis de proteínas (Wann y cols., 1989) y variaciones en el inhibidor tripsina (Carlberg y cols., 1987). Sin embargo, estos sistemas bioquímicos no se consideran demasiado adecuados porque consumen mucho tiempo o son insuficientemente específicos para identificar las fases posteriores del desarrollo.

Debido a que el programa de desarrollo de una célula implica la aparición o desaparición de proteínas específicas en un momento concreto, una alternativa para una identificación sencilla y rápida de callos embriogénicos podría ser el análisis de actividades enzimáticas e isoenzimas.

B.1. Actividades enzimáticas.

Existen numerosos estudios que relacionan la embriogénesis somática con los cambios detectados en la actividad de algunas enzimas como los que tienen lugar en las enzimas antioxidantes, esterasa, fenilalanina amonio liasa, malato deshidrogenasa y fosfatasa ácida.

- Algunas **enzimas antioxidantes** se utilizan como indicadores de la embriogénesis somática ya que parecen estar relacionadas con la regeneración de plantas (Dutta Gupta y Datta, 2003; Libik y cols., 2005). De acuerdo con Kairong y cols. (1999) la diferenciación y el desarrollo de células embriogénicas en la embriogénesis somática de *Lycium Barbarum* están regulados por tres enzimas antioxidantes que incluyen catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). Jariteh y cols. (2011) también propusieron que la embriogénesis somática secundaria de nogal persa podría estar regulada por estas enzimas antioxidantes.

Ghanti y cols. (2009), en garbanzo, observaron que la actividad de CAT aumentaba en las etapas globulares y alcanzaba su máximo en los embriones en forma de corazón, pero disminuía durante las etapas de torpedo, cotiledonar, y en la germinación. Por lo tanto, la CAT puede ser un útil marcador para identificar las etapas específicas de la embriogénesis somática.

Cordewener y cols. (1991) sugirieron que el aumento de POD es esencial para mantener el tamaño y la forma de las células del protodermo durante la embriogénesis somática.

POD y CAT son enzimas importantes responsables de la eliminación de H_2O_2 producido bajo diversas condiciones adversas y así evitar que se dé el daño oxidativo relacionado con el estrés (Willekens y cols., 1995). CAT elimina el H_2O_2 producido durante β -oxidación de ácidos grasos en la fase inicial del crecimiento de plántulas de oleaginosas (Bewley y Black. 1994). Las mayores actividades tanto de POD y CAT durante las fases del desarrollo embrionario sugieren que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es mayor en las primeras etapas de la embriogénesis que en las etapas finales (Bagnoli y cols., 1998; Ghanti y cols., 2009).

Cada vez existe un mayor número de publicaciones que relacionan las especies reactivas de oxígeno y la embriogénesis somática (Zavattieri y cols., 2010). El estrés oxidativo inducido por algunos compuestos incrementan los niveles celulares endógenos de auxina y promueven la desdiferenciación (Pasternak y cols., 2002; Correa-Aragunde y cols., 2006). Kairong y cols. (1999, 2002) sugirieron que la embriogénesis somática vegetal es un proceso de diferenciación celular especial y establecieron una relación entre ROS y la diferenciación celular. Trabajando con el arbusto *Lycium barbatum*, Kairong y cols. (2002) establecieron una correlación entre el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la inducción de la embriogénesis somática, de forma que niveles altos de H_2O_2 intracelular inducían y promovían la embriogénesis somática en esta especie. Sus resultados también revelaron que la SOD aumentaba gradualmente en los primeros días de la diferenciación de cultivos, y después disminuía gradualmente con la división y el desarrollo de los embriones pluricelulares. Dentro de la célula, SOD constituía la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno, convirtiendo el superóxido a H_2O_2 , y siendo este último eliminado por POD (Perl-Treves y Perl, 2002).

El H_2O_2 , generado por diversos estímulos ambientales y de desarrollo, puede actuar como un molécula de señalización que regula el desarrollo de la planta, la adaptación al estrés y la muerte celular programada (PCD) (Apel y Hirt, 2004). Así el H_2O_2 actúa como un segundo mensajero celular capaz de inducir la expresión de genes, la síntesis de proteínas y de promover la embriogénesis somática. En otro trabajo experimental, estos mismos autores, demostraron que el H_2O_2 podría regular la expresión génica de la respuesta celular oxidativa a nivel de transcripción así como la regulación de las enzimas antioxidantes como SOD. Vranová y cols. (2002) dedujeron que mientras que la

progresión del ciclo celular estuviera bajo el control negativo de ROS, el H₂O₂ estimulaba la embriogénesis somática.

- Las **esterasas** (EST; EC 3.1.1.2), un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces éster, aumentan la pectina y parecen tener un papel promotor en la embriogénesis (Joersbo y cols., 1989; Kairong y cols., 1999; Tchorbadjieva y Odjakova, 2001). Se ha sugerido una relación de estos enzimas con cambios producidos en las paredes celulares vegetales durante la adquisición de la capacidad embriogénica (Chibbar y cols., 1988). Un requerimiento para el desarrollo embriogénico de células vegetales es un contacto muy estrecho célula a célula (Fry, 1990). Se cree que la lámina media de pectinas mantiene juntas a las células vegetales y se ha propuesto que enzimas como las esterasas, que pueden unir polisacáridos de pectina covalentemente, podrían jugar un papel promotor en la embriogénesis (Van Engelen y De Vries, 1993)

- La **L-fenilalanina amonio-liasa** (PAL; EC 4.3.1.5), enzima clave involucrada en la asimilación y reciclaje de amonio (Bernard y Habash, 2009), también parece estar implicada en el proceso embriogénico.

La actividad de la PAL era mayor en las etapas torpedo y cotiledonar durante la embriogénesis somática de garbanzo pero disminuía durante la germinación (Ghanti y cols., 2009). Esto está de acuerdo con los resultados de Cvikrová y cols. (1994) que informaron sobre la existencia de mayores niveles de actividad PAL en callos embriogénicos en comparación con los callos no embriogénicos de *Medicago sativa* y con lo expuesto con Mihaljevic y cols. (2011) en cultivos de tejidos de calabaza en un medio inducido por amonio, lo que podría explicarse por una posible asimilación del nitrógeno por activación de la vía secundaria del metabolismo fenilpropanoide (Singh y cols., 1998). PAL cataliza la desaminación de L-fenilalanina para generar ácido trans-

cinámico y la duración de su actividad era característicamente corta y se correspondía con un período distinto del crecimiento en células cultivadas de plantas superiores (Ibrahim y Edgar, 1976). La ruta metabólica primaria vía shikimato produce ácidos fenólicos importantes, tales como el clorogénico, cafeico, p-hidroxibenzoico, trans cinámico y cumárico. Algunos de estos compuestos fenólicos actúan como precursores para la biosíntesis de la lignina. También se ha confirmado la función de ciertos fenoles como protectores de auxina, actuando para evitar su degradación (Kavi Kishor, 1989). Es posible que los productos de PAL puedan estar implicados en la biosíntesis de la lignina que es necesaria durante la embriogénesis (Ghanti y cols., 2009). Esto está de acuerdo con los estudios realizados en tejidos hiperhídricos (caracterizados por una apariencia vidriosa, con tallos y hojas translúcidas) donde una disminución en la actividad PAL se correlaciona con la disminución en la lignificación de las paredes celulares (Kevers y Gaspar, 1985).

- La actividad **malato deshidrogenasica** (MDH; EC 1.1.1.37) era más alta durante la germinación de embriones en garbanzo que en los cultivos no embriogénicos. MDH juega un papel importante durante la germinación de embriones somáticos suministrando la energía necesaria a través del ciclo de Krebs (Ghanti y cols., 2009). Estos resultados están de acuerdo con los de Kavi Kishor y Mehta (1988) quienes informaron que MDH era mayor en cultivos que formaban órganos en comparación con cultivos que no los formaban. La MDH cataliza la reacción de oxidación del malato y puede proporcionar NADPH para la biosíntesis reductora como fue mostrado por Fowler (1974), y la serie de reacciones implicadas en la conversión de NADP⁺ a NADPH puede generar CO₂ interno. Dhindsa y cols. (1975) indicaron que el malato puede actuar como un soluto osmótico para regular la expansión de células durante el crecimiento de la fibra de algodón. Dhindsa y cols. (1979) también notaron un aumento de la actividad de esta enzima en callos de tabaco que formaban brotes. Estos

autores sugirieron que MDH proporciona NADPH a los tejidos que forman los brotes, pero que actuaba como un soluto osmótico en callos que no los formaban.

- **Fosfatasa ácida** (ACP; EC; 3.1.3.2). Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de ésteres del ácido fosfórico. Se clasifican en fosfatasas ácidas (E.C. 3.1.3.2) y alcalinas (E.C. 3.1.3.1). Las ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores, mientras que las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos (Speir y Ross, 1978, Tabatabai, 1994).

La fosfatasa ácida es común en la célula y se ha detectado asociada a la pared celular, a los dictiosomas y lisosomas. En algunos trabajos se ha sugerido la utilización de esta enzima como marcadora de la embriogénesis somática. Menéndez-Yuffá y García (1996), en café, y Marcano y cols. (2006), en caña de azúcar, detectaron una actividad fosfatasa ácida mayor en callos embriogénicos que en los no embriogénicos. Dicha actividad podría utilizarse como marcadora de los procesos de diferenciación que ocurren durante el cultivo *in vitro*.

B.2. Isoenzimas.

Como definió la comisión en nomenclatura biológica de la IUPAC-IUB (Moss, 1982) las isoenzimas son múltiples formas moleculares de una misma enzima que ocurren en una misma especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificando para cada una de ellas. Las isoenzimas llevan a cabo una misma actividad catalítica, pero presentan diferentes movilidades electroforéticas, originadas por las diferencias en secuencias de aminoácidos y, por lo tanto, por las variaciones en las secuencias de ADN que codifican para estas enzimas. Las isoenzimas, o isoformas, son fácilmente detectables y su

variación está a menudo asociada con las diferencias genéticas y etapas de desarrollo (Scandalios, 1974).

Muchos son los ejemplos donde se han utilizado isoenzimas como marcadores de cultivos embriogénicos.

Mediante electroforesis en gel de almidón, Everett y cols. (1985) analizaron zimogramas de la glutamato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, β -glucuronidasa y esterasa en maíz. Encontraron que zimogramas de esterasa y glutamato deshidrogenasa servían para distinguir entre cultivos embriogénicos y organogénicos.

También en maíz patrones de isoenzimas POD, EST, MHD mostraron variaciones en el número total de bandas entre callos embriogénicos y no embriogénicos (Rao y cols., 1990).

Bagnoli y cols. (1998), en castaño de indias, Libik y cols. (2005), en la planta de hielo (*Mesembryanthemum crystallinum*), y Blázquez y cols. (2009), en azafrán, observaron cambios en las isoformas de SOD durante el desarrollo de embriones somáticos. Platiša y cols. (2008) en *Medicago sativa* utilizaron isoenzimas POD y SOD para diferenciar los callos embriogénicos.

Las isoenzimas EST, POD, transaminasa glutámico oxalacética (GOT) y la fosfatasa ácida se utilizaron para distinguir callos embriogénicos de no embriogénicos en batata dulce (*Ipomoea batatas*) (Cavalcante y cols., 1994). Cambios en los patrones isoenzimáticos de POD y EST han sido utilizados para analizar diferentes fases de la embriogénesis somática en monocotiledóneas (Coppens y Dewitte, 1990; Rao y cols., 1990; Bapat y cols., 1992), en *Mammillaria gracilis* (Balén y cols., 2003) y en calabaza (Mihaljevic y cols., 2011), mientras que ACP no fue adecuada para discriminar entre callos embriogénicos y no embriogénicos en maíz (Fransz y cols., 1989) ni en caña

de azúcar (Marcano y cols., 2006) y tanto la ACP como la EST no dieron información en cebada y trigo (Chawla, 1988).

Las variaciones en las isoperoxidasas fueron documentadas como los marcadores de la embriogénesis somática en calabaza (Krsnik-Rasol y cols., 1982), en zanahoria (Joersbo y cols., 1989) y en alfalfa (Platiša y cols., 2008).

Las isoesterasas también se han estudiado como marcadores del potencial embriogénico y del desarrollo de embriones en zanahoria (Chibbar y cols., 1988), cebada (Pedersen y Andersen, 1993), maíz (Rao y cols., 1990), trigo (Bapat y cols., 1992) y *Dactylis glomerata* (Tchorbadjieva y Odjakova, 2001).

C. APLICACIONES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

La rápida mejora en los métodos de la embriogénesis somática ha permitido la ampliación de sus aplicaciones científicas y comerciales:

C.1. Estudios embrionarios.

La embriogénesis somática ofrece un excelente sistema experimental para estudiar los aspectos fisiológicos y bioquímicos del desarrollo del embrión (Shoahel y cols., 2007). Uno de los principales usos de la embriogénesis somática consiste en su utilización en la investigación de las etapas iniciales de la embriogénesis cigótica en las plantas superiores. Los embriones cigóticos de las plantas superiores constan de varias células pequeñas que crecen dentro de los tejidos maternos, como flores o frutos inmaduros, y es muy difícil reunir suficientes embriones como para realizar los análisis bioquímicos, fisiológicos y morfológicos de los programas biológicos que ocurren en el proceso de

desarrollo temprano. Los embriones somáticos proporcionan un buen modelo por el cual este tipo de problemas se podrían evitar. El conocimiento de muchos de los acontecimientos que ocurren durante la embriogénesis temprana se debe a los experimentos realizados en la embriogénesis somática (De Jong y cols., 1993; Kiyosue y cols., 1993; Zimmerman, 1993).

C.2. Propagación de plantas.

La propagación tradicional de plantas se realiza a partir de fragmentos de la planta o por semillas. La escasez de semillas sanas y del material vegetal adecuado a menudo afecta a la propagación masiva de algunas especies como por ejemplo de las hortícolas (Joung y cols., 2002). La producción a gran escala de clones de élite a través de la micropropagación o embriogénesis somática resolvió este problema. La propagación clonal por embriogénesis somática se ha convertido en un método esencial para la mejora de la mayoría de las plantas económicamente importantes (Menéndez-Yuffá y cols., 2010).

Este tipo de embriogénesis reduce el tiempo requerido para la propagación de plantas ya que permite realizar el cultivo de gran número de unidades reproductivas: los embriones somáticos con frecuencia se originan a partir de una sola célula y así se pueden sincronizar en cultivos en medio líquido que permiten tratar con cultivos puros de material prácticamente homogéneo. Así se logra la regeneración de algunas plantas de células aisladas con las características genéticas deseadas (Jacobs y cols., 1987; Toonen y de Vries, 1996), haciendo posible su uso en programas de selección celular

Las plántulas derivadas de un cultivo *in vitro* pueden presentar fenotipos anormales, a menudo hereditarios. Esta variabilidad se conoce como variación somaclonal y ha sido ampliamente descrita en plantas derivadas de embriones

somáticos (Amberger y cols., 1992.; Fourré y cols., 1997; Kuksova y cols., 1997; Yang y cols., 2008; Suliman Elmeer y cols., 2009; Prado y cols., 2010b; Lucia y cols., 2011). Las variaciones somaclonales son un problema en la micropropagación clonal *in vitro* (Corley y cols., 1986; Jain y cols., 1998) pero dan la oportunidad de descubrir la variabilidad genética natural y de utilizar esta variabilidad para la mejora de plantas (Larkin y Scowcroft, 1981; Evans, 1989; Anwar y cols., 2010; Prado y cols., 2010b).

La variación somaclonal puede producir características agronómicas deseables como son un aumento en la tolerancia a la sal, la resistencia a herbicidas, a enfermedades, a temperaturas extremas e incluso al aluminio o la desecación (Maluszynsky y cols., 1995). Por ejemplo, la selección de células y la regeneración a través de la embriogénesis somática se han utilizado para mejorar la tolerancia a la sal y la resistencia a las enfermedades en los cítricos (Litz y cols., 1985), resistencia a los virus y tolerancia a la sal en la caña de azúcar (Oropeza y de Gracia, 1996; Khan y cols., 2004a), germinación a bajas la temperatura en melón (Ezura y cols., 1995) y resistencia a fitotoxinas en el café (Nyange y cols., 1995).

C.3. Transformación genética.

La transformación genética que introduce genes extraños en el genoma vegetal es una práctica habitual en muchas especies vegetales y se ha convertido en una herramienta indispensable para la mejora de cultivos (Potrykus, 1990). Sin embargo, en algunas especies, la falta de un método de regeneración eficiente dificulta el uso de esta tecnología. Para estas especies, el desarrollo de métodos de regeneración basados en la embriogénesis somática podría ser la solución como lo ha sido para el café (Spiral y cols., 1993), yuca (Schöpke y cols., 1996), cacao (Silva y cols., 2009) y maíz

(González y cols., 2012) entre otros. También se han utilizado para conseguir resistencia a herbicidas como en la adormidera (Facchini y cols., 2008), para aumentar la producción de la biomasa utilizada para obtener biocombustibles en *Panicum virgatum* (Burriss y cols., 2009; Xu y cols., 2011), la resistencia a enfermedades en cacahuete (Singsit y cols., 1997) o aumentar la obtención de plantas ornamentales (Vergne y cols., 2010). El método que se ha utilizado durante mucho tiempo para la transferencia de genes está mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

C.4. Formación de híbridos somáticos.

Otra aplicación es la de obtener plantas con diferentes niveles de ploidía ya que la embriogénesis somática puede producir espontáneamente poliploidía en las plantas regeneradas, como se observó en melón (*Cucumis melo*), *Lochroma warscewiczii* y *Vitis vinifera* (Canhoto y cols., 1990; Ezura y Oosawa, 1994; Prado y cols., 2010b). La aplicación de la colchicina u otras drogas en el medio embriogénico aumentó el número de embriones poliploides producidos (Gmitter y cols., 1991. Binarova y Dolezel, 1993). También se han obtenido embriones haploides por cultivo de anteras y triploides a partir del endospermo (Garg y cols., 1996; Thomas y Chaturvedi, 2008).

C.5. Criopreservación y obtención de semillas sintéticas.

El almacenamiento de semillas en condiciones secas y frías ofrece un método conveniente para almacenamiento a largo plazo del germoplasma. Sin embargo, las semillas de algunas especies no se pueden almacenar a temperaturas bajas o no son tolerantes a la desecación. Por otra parte, algunas especies de cultivo sólo se propagan vegetativamente, causando muchos problemas de conservación

La conservación a largo plazo de células vegetales, de embriones somáticos y de callos embriogénicos, usando nitrógeno líquido, es una importante herramienta para la conservación del germoplasma sin causar variaciones genéticas (Kong y Von Aderkas, 2011; Vasanth y Vivier, 2011; Vieitez y cols., 2011)

El éxito en la inducción de la latencia, y conseguir el almacenamiento a largo plazo, junto con el logro de encapsulación de los embriones somáticos, también ha abierto la posibilidad para su uso en la tecnología de semillas sintéticas (Gray y Purohit, 1991; Gray y cols., 1995; Litz y Gray, 1995; Rai y cols., 2009; Kong y Von Aderkas, 2011; Vasanth y Vivier, 2011).

C.6. Obtención de protoplastos.

El uso de callos embriogénicos y cultivos de células en suspensión, así como de embriones somáticos como una fuente de protoplastos, se ha explotado para una gama de especies, usando la ventaja de la totipotencia de estos cultivos embriogénicos (Merkle y cols., 1990). Se ha demostrado que los cultivos embriogénicos son especialmente valiosos como fuente de protoplastos en gramíneas (Finch y cols., 1991; Chang y Wong, 1994; Lyznik y Hodges, 1994; Funatsuki y cols., 1996), cítricos (Jiménez, 1996), y especies forestales (David, 1987; McCown y Russell, 1987).

Estos protoplastos pueden ser utilizados para la transformación genética antes mencionada y para la obtención de híbridos somáticos mediante fusión de protoplastos (Guan y cols., 2010; Prange y cols., 2010; Rezazadeh y cols., 2011).

C.7. Producción de metabolitos.

La embriogénesis ofrece un gran potencial para la producción *in vitro* de metabolitos de embriones, como los lípidos y las proteínas de almacenamiento de semillas (Merkle y cols., 1990), los productos farmacéuticos (Awad y cols., 2011; Raghu y cols., 2011) y otros metabolitos secundarios (Paek y cols., 2005). Esto solucionaría el problema que origina la obtención de metabolitos de forma tradicional donde se necesitarían grandes cantidades de plantas, tejidos u órganos para su obtención ya que se producen pequeñas cantidades de los metabolitos.

II. VALOR NUTRITIVO DE LAS LEGUMINOSAS. IMPORTANCIA FORRAJERA.

Las leguminosas o legumbres se consideran un grupo importante de plantas que sirven de alimento para hombres y animales, especialmente en los países en vías de desarrollo, al ser una fuente proteica bastante abundante y barata.

En el año 2001, la Comisión Europea (Directiva de la CE 999/2001) prohibió el uso de harinas de carne, hueso y derivados animales en las dietas para el ganado. Se pretendía con esto garantizar la seguridad de los consumidores cuando se alimentan de productos de origen animal. Como alternativa, la harina de soja (SBM) fue el suplemento de proteínas de origen vegetal más utilizado en las dietas de animales, ya que era una fuente abundante de proteínas y presentaba gran calidad. Como SBM era el principal subproducto de la extracción de aceite de soja, el coste y la disponibilidad de

SBM estaban muy correlacionados con la evolución de los precios de los productos agrícolas en el mercado mundial. Los factores que podían influir en los precios del mercado mundial incluían variaciones en la población, el crecimiento económico, los cambios en las preferencias de productos de consumo y las condiciones climáticas de maduración (Gill, 1997; Trostle, 2008).

La reciente expansión en la industria de los biocombustibles también supuso un incremento en la demanda de alimentos ricos en almidón y azúcares con el consiguiente aumento del precio para tales cultivos (Runge y Senauer, 2007).

Además, la producción limitada de soja en Europa (Blair, 2007) y la posición de los países de la UE con respecto a la soja modificada genéticamente reforzó la importancia de otras fuentes de alimento.

La búsqueda de fuentes alternativas de proteínas aumentó el interés por las leguminosas de grano. Estas leguminosas, además, se cultivan en sistemas de rotación con otros cultivos (López-Bellido y cols., 2005) lo que puede reducir el uso de fertilizantes de nitrógeno (Peoples y cols., 1995) y aumentar la fertilidad del suelo; además, la incidencia de malezas, plagas y enfermedades podía reducirse (Peoples y cols., 1995; Mwanamwenge y cols., 1998). En algunos casos, como por ejemplo utilizando *Vicia faba*, se podían utilizar también como cubierta de suelos para evitar así su erosión (Köpke y Nemecek, 2010).

La presencia de proteínas y almidón en proporciones adecuadas, junto con la fibra, vitaminas y microelementos, ha hecho que las leguminosas sean un foco de justificado interés nutricional (Leterme, 2002). Sin embargo, los problemas de digestibilidad y la escasa disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales limitan en gran medida la utilización de las proteínas de leguminosas. La baja digestibilidad se ha atribuido a muchos factores: la

estructura de conformación de las proteínas, la interacción de las proteínas con otros componentes de la semilla para formar complejos (Nielsen, 1991) y la presencia de factores antinutricionales que actúan como un mecanismo de autodefensa de la planta pero problemáticos cuando se suministran a los animales (Kim y cols., 2007; Mekbungwan, 2007). Estos factores antinutricionales o factores nutricionales activos (FANs), impiden la digestión y la absorción de algunos de sus componentes más interesantes (por ejemplo, proteínas, vitaminas) o, en algunos casos, son simplemente tóxicos (alcaloides) o causan efectos fisiológicos indeseables (por ejemplo, flatulencia) (Muzquiz y Wood, 2007).

Por lo tanto, el valor nutritivo de las leguminosas de grano depende principalmente de su contenido en nutrientes y de la presencia o ausencia de factores antinutricionales o tóxicos que pueden provocar respuestas fisiológicas adversas o disminuir la disponibilidad de ciertos nutrientes (Shimelis y Rakshit, 2005).

A. FACTORES NUTRICIONALES.

Se considera valor nutritivo a la capacidad del alimento para proporcionar una forma útil de nutrientes: proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Ramakrishna y cols., 2006).

A.1. Composición mineral.

La ganadería, por lo general, obtiene la mayor parte de sus nutrientes de los alimentos que consumen en la dieta. Las fuentes para la obtención de minerales proceden de diferentes tipos de alimentos como son los pastos, los forrajes de corte, los concentrados y suplementos de minerales (McDowell y

Arthington, 2005). Sin embargo, los esfuerzos para minimizar el coste de los suplementos minerales en la producción ganadera requieren un profundo conocimiento de la oferta y la disponibilidad de esos nutrientes minerales en piensos y forrajes (Dost y cols., 1990). El nivel de minerales en las plantas depende de las interacciones entre una serie de factores que incluyen el tipo de suelo, las especies de plantas, la etapa de madurez, el rendimiento de la materia seca, el manejo del pastoreo y el clima (McDowell y cols., 1983; Khan y cols., 2005). Aunque la información sobre la concentración total de un mineral en un pienso es importante, la biodisponibilidad del mineral es igualmente importante ya que varía considerablemente entre las diferentes especies y razas animales dentro de una misma especie, así como entre los diferentes alimentos.

Las leguminosas alimenticias son una buena fuente de minerales como el calcio, hierro, cobre, zinc, potasio, fósforo y magnesio (Salunkhe y cols., 1985).

Se ha sugerido que las especies con mayor P y K en sus hojas son más productivas y más beneficiosas para el ganado, debido a que estos elementos son igualmente muy importantes (Ashraf y cols., 1992; Irigoyen y cols., 1992). El calcio y el magnesio son también muy útiles para el ganado, porque ambos elementos son esenciales para el crecimiento normal de los animales (Walker, 1980; Underwood, 1981; Aregheore y Hunter, 1999; Khan y cols., 2004b). Los problemas sencillos como los calambres y espasmos musculares emergen en animales debido a la deficiencia de Ca, Mg y otros electrolitos. La producción de enzimas digestivas en los animales se ve perjudicada si los minerales no están lo suficientemente disponibles. El balance de minerales es de vital importancia para la salud animal al igual que su disponibilidad y asimilación. El cuerpo puede tolerar una deficiencia de vitaminas durante más tiempo que una deficiencia en minerales (Grunes y Welch, 1989).

A.2. Proteínas.

El valor nutritivo o la calidad de las proteínas se rige por su composición de aminoácidos, la proporción de aminoácidos esenciales con respecto a la de aminoácidos no esenciales, la susceptibilidad a la hidrólisis durante la digestión, la fuente y el efecto de procesamiento (Radha y cols., 2007; Schuster-Gajzago y cols., 2006), etc..

La fracción proteica predominante en semillas de legumbre está formada por globulinas (60-90%) que son proteínas de reserva ricas en arginina, ácido glutámico, ácido aspártico y sus amidas, y pobres en aminoácidos sulfurados. Las semillas de legumbre también contienen albúminas (10-20%), donde se incluyen proteínas con actividad biológica, más ricas en triptófano y treonina que las globulinas (Guéguen y Azanza, 1985; Degussa, 2006; Jezierny y cols., 2010).

Chandna y Matta (1994) encontraron que la composición proteica de las semillas de *Lathyrus sativus* era: albúminas (14%), globulinas (66%), glutelinas (15%) y prolaminas (5%), y del mismo modo, Duke (1981) cita también valores de 26, 53, 15 y 6%, respectivamente.

El principal obstáculo al utilizar legumbres como fuente de proteína en las dietas animales, fue su bajo nivel de aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, y, también, de triptófano (Gatel y Grosjean, 1990; Gatel, 1994; Mekbungwan, 2007). Pastor-Cavada y cols. (2011) estudiaron las características proteicas en 15 especies de *Lathyrus* y encontraron que los aminoácidos esenciales más abundantes eran leucina, lisina, fenilalanina, treonina y valina. Además, todas las especies contenían lisina por encima de las recomendaciones de la FAO (FAO, 1985). Por el contrario, todas las especies estaban limitadas en triptófano, desde 0,5% a 0,8% de contenido, y también en aminoácidos azufrados, metionina y cisteína.

También en semillas de *Vicia faba* el análisis de aminoácidos reveló una composición proteica similar a la de otras leguminosas de grano, y se caracterizó por una buena calidad nutricional, excepto por ser deficiente en aminoácidos azufrados y triptófano (Vioque y cols., 2012).

Si complementamos adecuadamente las proteínas de legumbres con otras fuentes proteicas ricas en aminoácidos azufrados y triptófano, como cereales, las legumbres se pueden incluir en las dietas para animales sin ningún efecto negativo sobre el crecimiento (Partanen y cols., 2003; Stein y cols., 2004; Zraly y cols., 2007).

Otros factores, además de la composición de aminoácidos, pueden determinar la calidad nutricional de las proteínas de los alimentos. Para hacer uso de los aminoácidos de estas proteínas primero deben ser digeridas con el fin de liberarlos. Así, la digestibilidad de la proteína por las enzimas digestivas es también un factor determinante de la calidad nutricional de una proteína. Desde un punto de vista nutricional una proteína debe tener una equilibrada composición de aminoácidos y una digestibilidad alta. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* propusieron que la digestión de las proteínas de reserva de los granos de leguminosas es limitada debido a la estructura y conformación de estas proteínas (Chang y Satterlee, 1981; Jivotovskaya y cols., 1996). Por ejemplo, las globulinas de soja (glicinina y conglucina) se digirieron bien *in vitro* (Nielsen y cols., 1988), mientras que la digestibilidad *in vivo* de la faseolina, una globulina de la proteína de frijol se redujo en los cerdos y las ratas (Begbie y Ross, 1993; Santoro y cols., 1999). Estudios *in vivo*, además, revelaron que las globulinas de guisantes (vicilina y legumina) podían ser degradadas por las enzimas proteolíticas, mientras que las albúminas eran resistentes en el estómago y el intestino delgado porcino (Salgado y cols., 2003; Le Gall y cols., 2005). Por lo tanto, las propiedades estructurales propias de las principales globulinas de almacenamiento, pueden ser factores importantes que limitan la

digestión de las proteínas durante el paso a través del tracto gastrointestinal (Carbonaro y cols., 2000).

Kasprowicz y Frankiewicz (2004) y Jezierny (2009) propusieron que las diferencias en la digestibilidad de proteínas y aminoácidos, en algunos cultivos de leguminosas, estaban vinculados a las variaciones en su composición química, en particular, a su mayor o menor contenido de metabolitos secundarios inherentes a diferentes cultivos. Por ejemplo, la digestibilidad de proteínas y aminoácidos en habas y guisantes de variedades de flores blancas son más altos que los cultivos de flores de color debido a su alto contenido de taninos (Kasprowicz y Frankiewicz, 2004; Jezierny, 2009).

A.3. Carbohidratos y fibra.

La fracción de carbohidratos presente en las leguminosas incluye azúcares de bajo peso molecular, almidón y varios polisacáridos no amiláceos (NSP) (Bach Knudsen, 1997). NSP y lignina son los principales componentes de las paredes celulares y se conocen comúnmente como fibra dietética (Theander y cols., 1989; Canibe y Bach Knudsen, 2002).

Esta fracción de carbohidratos proporciona una importante fuente de energía y su composición difiere considerablemente de la de los cereales (Bach Knudsen, 1997). Los cereales contienen cantidades más altas de almidón que habas, guisantes y altramuces, mientras que estas leguminosas de grano tiene una mayor cantidad de azúcares solubles (total de monosacáridos, sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa) y NSP (Bach Knudsen, 1997).

El almidón es la principal fuente de energía en las dietas de muchos animales, pero el almidón de legumbres, en general, proporcionaba menos energía disponible, especialmente en animales monogástricos, que en los cereales debido a su alto contenido de amilosa (casi el doble), cuya estructura

dificulta la acción de las enzimas, y a las propiedades de los gránulos (Aranda y cols., 2001). Goelema (1999) revisó el mecanismo de degradación del almidón por los microorganismos del rumen observando que las características físicas de los cuerpos de almidón afectaban a la accesibilidad de la enzima. El tratamiento térmico de los granos provoca la gelatinización del almidón, la estructura cristalina del almidón se funde y se destruye en condiciones de alta temperatura; los gránulos de almidón se rompen y se convierte en un sustrato más accesible siendo hidrolizado fácilmente por las enzimas (Alonso y cols., 2000). La fracción de almidón resistente en legumbres corresponde al almidón físicamente inaccesible que está atrapado en la matriz celular (Englyst y cols., 1992) y, en muchos casos, esta se rompe por el procesamiento (González-Soto y cols., 2006). El tratamiento térmico causaba una reducción significativa en la resistencia y en el almidón mal digerible y un aumento del almidón digestible en guisantes (Periago y cols., 1996), garbanzos y judías comunes (Marconi y cols., 2000).

Hay pocos datos que muestren la capacidad que tienen diferentes fuentes de almidón de influir en la utilización de otros nutrientes en la dieta. Parece como si la mayoría del almidón fácilmente digerible (gelatinizado) no influyera en la digestibilidad de las proteínas pero, sin embargo, mejora la energía y digestibilidad del almidón (Peres y Oliva-Teles, 2002). Adamidou y cols. (2009), observaron una mayor digestibilidad aparente para dietas que combinaban trigo y almidón de legumbres que para la dieta que incluía solamente trigo o alguna legumbre.

Las leguminosas contienen, además del almidón, altos niveles de fibra dietética. La acción principal de las fibras se produce en el tracto gastrointestinal, presentando diferentes efectos fisiológicos. En efecto, los efectos fisiológicos causados por las fibras, tales como la alteración del tiempo de tránsito gastrointestinal, cambios de saciedad, la influencia sobre los niveles

de colesterol, de glucosa sérica y de insulina después de las comidas, la flatulencia y la alteración en la biodisponibilidad de los nutrientes, se demostró que se debían a las propiedades físico-químicas de sus constituyentes (Hopwel y cols., 1993; Lajolo y cols., 2001).

Se ha comprobado que las habas y guisantes contienen cantidades relativamente bajas de fracciones de fibra en comparación con los altramuces (Bach Knudsen, 1997; Jezierny, 2009), y, en relación con el contenido de lignina, las habas y *Lupinus angustifolius* tienen cantidades similares, mientras que el contenido de lignina en guisantes es de menor importancia (Salgado y cols., 2002a; Jezierny, 2009).

A.4. Ácidos grasos.

Con respecto a la composición de ácidos grasos, la proporción más alta de los insaturados esenciales en algunas legumbres de grano, por ejemplo en algunas especies de *Vicia* (Akpinar y cols., 2001) o *Lupinus albus* (Erbas y cols., 2005), puede resultar muy atractiva tanto para la alimentación del ser humano como para la animal (Bézard y cols., 1994); sin embargo, se deben tener en cuenta los efectos adversos de los ácidos grasos insaturados en la calidad de la carne (Wood y cols., 2003). En habas se ha informado de una proporción de ácidos grasos saturados frente a los insaturados de 40-60 (Akpinar y cols., 2001), mientras que en *L. albus*, la proporción de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados era de 13,5/ 55,4/ 31,1 (Erbas y cols., 2005).

Los ácidos linoleico y linolénico son los ácidos grasos esenciales más importantes para el crecimiento y mantenimiento de las funciones fisiológicas en los animales (Pugalenthi y cols., 2004).

Existe abundante literatura sobre la composición de ácidos grasos de semillas de plantas. El ácido linoleico y ácido oleico fueron identificados como ácidos grasos predominantes en los guisantes (Bastianelli y cols., 1998), al igual que en habas (Duc y cols., 1999) y en altramuces (Petterson, 2000). En frijoles, se encontró que el ácido palmítico y el oleico eran los ácidos grasos principales (Akpinar y cols., 2001). Prabhakara Rao y cols. (2010) encontraron que la composición de ácidos grasos en el aceite de semillas de *Entada pursaetha* eran el ácido palmítico (8,8%), ácido oleico (37,2%), el ácido linoleico (43,9%) y el ácido eicosanoico (1%).

Estudios realizados con *Vicia faba* incluían la misma cantidad de ácidos grasos saturados (22,3%) que de monoinsaturados (21,7%), principalmente los ácidos palmítico y oleico eran similares; el 56% (w/w) se correspondía con ácidos grasos poliinsaturados, principalmente con el ácido linoleico (C18: 2 51,6%) y otros ácidos grasos diferentes (C18:1 21,2%, C16:0 17,6%, C18:3 4,4%, C18:0 3,4%, C20:0 1,3%, y C20:1 0,5%) (Vioque y cols., 2012).

B. FACTORES ANTINUTRICIONALES (FAN).

Las leguminosas de grano contienen una serie de metabolitos secundarios vegetales, también conocidos como sustancias bioactivas (Champ, 2002), que puede ejercer una amplia gama de efectos diferentes sobre los animales que los consumen. Estos efectos se han descrito como positivos, negativos o ambos (Champ, 2002; Jamroz y Kubizna, 2008). La mayoría de metabolitos secundarios de plantas, sin embargo, como los taninos, inhibidores de la proteasa, alcaloides, lecitinas, glicósidos y saponinas se han clasificado como factores antinutricionales (FAN) (por ejemplo, Liener, 1989; D'Mello, 1995), debido a que pueden perjudicar el rendimiento del crecimiento, la

fertilidad y el estado de salud del ganado debido a una variedad de mecanismos subyacentes (Huisman y Tolman, 2001; Brenes y cols., 2004; Pusztai y cols., 2004). Estos metabolitos secundarios de las plantas se pueden dividir en dos categorías principales: un grupo lábil al calor, como los inhibidores de las proteasas y lectinas, que son sensibles a las temperaturas que se producen durante el procesamiento del alimento, y un grupo estable al calor que incluye los taninos, alcaloides, cianógenos y saponinas, estables a las temperaturas de procesamiento (D'Mello, 1995).

B.1. Inhibidores de proteasas: de tripsina y quimiotripsina.

Los inhibidores de proteasas son compuestos termolábiles que alteran la digestibilidad de las proteínas y que están ampliamente distribuidos en semillas vegetales (Liener y Kakade, 1980). La mayoría de las leguminosas de grano contienen cantidades considerables de estos inhibidores (Huisman y Tolman, 2001). La soja es una de las leguminosas que contienen mayor cantidad de inhibidores de proteasas (Le y Dworschak, 1986; Saini, 1989). Tradicionalmente, los inhibidores de proteasas pertenecen a dos clases principales, el inhibidor de tripsina Kunitz (KTI), que está presente principalmente en la soja, y la familia de inhibidores tripsina/quimiotripsina Bowman-Birk (BBI), que se produce ampliamente en las leguminosas de grano (Huisman y Tolman, 2001; Pusztai y cols., 2004). BBI es una pequeña proteína soluble en agua, presente en la soja y en casi todas las semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Losso, 2008). BBI puede inhibir fuertemente tanto tripsina como quimiotripsina, dos importantes enzimas pancreáticas responsables de la digestión de las proteínas en el tracto gastrointestinal. KTI produce una fuerte inhibición en la tripsina y una inhibición más débil sobre quimiotripsina.

Estos inhibidores son destruidos en el rumen por lo que no suponen un problema para los animales rumiantes. En las especies monogástricas, los inhibidores de proteasas forman complejos inactivos relativamente estables con las enzimas proteolíticas pancreáticas tripsina y quimotripsina (Liener y Kakade, 1980; Lallès y Jansman, 1998); liberan colecistoquinina para suprimir la regulación por retroalimentación negativa de las secreciones pancreáticas, lo que puede estimular la hipertrofia del páncreas; reducen la hidrólisis de proteínas de la dieta, disminuyendo la absorción de aminoácidos y la síntesis de proteínas *de novo* (Roy y cols., 2010).

Además, un aumento de la secreción pancreática de tripsina y quimotripsina, debido a la actividad del inhibidor tripsina, puede conducir a una pérdida mayor de la metionina y cisteína endógenas, ya que estas enzimas pancreáticas son ricas en aminoácidos azufrados (Gatel, 1994). Estas pérdidas de metionina y cisteína, pueden disminuir el crecimiento animal ya que las legumbres de grano son ya deficientes en aminoácidos azufrados.

De acuerdo con Jezierny y cols. (2007), las leguminosas de grano, como guisantes, habas y altramuces, contienen niveles más bajos de inhibidores de proteasa que la soja. La soja se utiliza ampliamente para la alimentación animal pero debe ser calentada para destruir los inhibidores de la proteasa antes de ser utilizada en la alimentación de animales monogástricos.

B.2. Inhibidores de amilasas.

La amilasa es la enzima que participa principalmente en la digestión del almidón en los mamíferos. La α -amilasa y la α -glucosidasa son enzimas clave que intervienen en la degradación del almidón y en la absorción intestinal de glucosa (McDougall y Stewart, 2005). Los inhibidores de amilasa se cree que reducen la actividad de la amilasa (Deshpande y Damodaran, 1990) y han

llamado la atención ya que tienen capacidad para inhibir las enzimas digestivas de diferentes fuentes, incluyendo los mamíferos, insectos y hongos (Moreno y Chrispeel, 1989; Dias y cols., 2005). En las plantas, estos inhibidores se producen como parte de los mecanismos de defensa, ya que son particularmente abundantes en leguminosas (Marshall y Lauda, 1975; Giri, y Kachole, 1998; Melo y cols., 1999) y cereales (Yamagata y cols., 1998; Franco y cols., 2000).

Los inhibidores de α -amilasa, dependiendo del número de residuos de aminoácidos y del contenido de cisteína, se han clasificado en seis tipos diferentes en base a su estructura terciaria: tipo Knottin, tipo Knutiz, tipo purotionina, tipo taumatina, tipo cereales, tipo lectina-leguminosas (Richardson, 1991; Franco y cols., 2002; Dayler y cols., 2005).

Los efectos adversos asociados con los inhibidores de la α -amilasa podían deberse a la inhibición excesiva de una α -amilasa pancreática que da como resultado una fermentación bacteriana anormal de hidratos de carbono que no son digeridos en el colon (Bischoff y cols., 1985).

A estos inhibidores también se les conoce porque en las llamadas pastillas de adelgazamiento actúan como bloqueadores evitando que el almidón de la dieta sea utilizado por el cuerpo humano (Richardson, 1991). La α -amilasa y sus inhibidores son drogas de diseño para el desarrollo de compuestos en el tratamiento de diabetes, obesidad e hiperlipidemia (Franco y cols., 2000).

En los últimos años, las fuentes naturales de inhibidores de α -amilasa tienen un gran interés debido a la búsqueda de alternativas a inhibidores sintéticos de la enzima, pero se ha encontrado que presentan efectos adversos, poca eficacia y pueden causar malestar gastrointestinal como efecto secundario (Randhir y cols., 2008). Ciertos compuestos fenólicos vegetales

tienen la capacidad de inhibir parcialmente la actividad de una enzima amilasa ya que son capaces de unirse con los sitios reactivos de la α -amilasa alterando sus efectos catalíticos y, por tanto, se ha demostrado que poseen beneficios terapéuticos tales como el efecto hipoglucémico, siendo útiles en el tratamiento dietético de la diabetes tipo II (Chethan y cols., 2008; Kunyangaa y cols., 2012).

B.3. Lectinas.

Las lectinas están presentes en la mayoría de las leguminosas (Liener, 1989). Se encuentran en una amplia gama de leguminosas de grano como habas, guisantes, soja y altramuces (Valdebouze y cols., 1980; Gupta, 1987; Huisman y Tolman, 2001). Interfieren con la digestión y absorción de nutrientes dando lugar a una reducción en la eficacia de su utilización.

Las lectinas, también conocidas como fitohemagglutininas, son compuestos glicoproteicos que aglutinan los glóbulos rojos *in vitro* (Gatel, 1994), una característica que puede ser utilizada para identificar y detectar las lectinas en los ingredientes de piensos (D'Mello, 1995). *In vivo*, las lectinas pueden unirse a receptores de las células epiteliales de la mucosa intestinal y alterar los procesos digestivos al deteriorar el transporte de nutrientes a través de la pared intestinal (Gatel, 1994). Otros efectos de las dietas que contienen lectina incluyen cambios en la función inmune intestinal, reduciendo la producción de células endocrinas y hormonas intestinales, afectando a la ecología bacteriana del intestino al incrementar el crecimiento selectivo de ciertas cepas y dañando a las células de la mucosa (King y cols., 1983).

Las lectinas pueden ser tóxicas, aunque, una pequeña cantidad puede ser beneficiosa ya que estimula la función intestinal, lo que limita el crecimiento de tumores y presenta una ventaja frente a la obesidad (Pusztai y cols., 2004; Lam y Ng, 2011).

B.4. Taninos.

La presencia de taninos en árboles, arbustos, leguminosas de grano y cereales de importancia nutricional, a menudo limita su utilización como alimento, como fue evidenciado por Silanikove y cols. (1997).

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua, presentes en las diferentes plantas, incluyendo habas, guisantes, sorgo, cebada, trébol y alfalfa (Jansman, 1993). Se pueden separar en dos subgrupos, taninos hidrolizables y taninos no hidrolizables o condensados (proantocianidinas) (Jansman, 1993). Los taninos pueden tener una considerable influencia en el valor nutritivo de las leguminosas de grano, en parte por la disminución de la palatabilidad debido a sus propiedades astringentes, que son causadas por su unión con las proteínas de la saliva y la membrana de la mucosa bucal durante la masticación de alimentos (Akinyede y cols., 2005). También se les ha atribuido la capacidad de unirse a proteínas, aminoácidos y minerales, tales como hierro, zinc y calcio, constituyentes de los alimentos, disminuyendo su digestibilidad (Liener, 1989; Gilani y cols., 2005). Los taninos interactúan tanto con proteínas enzimáticas como no enzimáticas para formar complejos proteínas-tanino que producen la inactivación de enzimas digestivas reduciendo la digestibilidad de la proteína (Crépon y cols., 2010; Khandelwal y cols., 2010; Wang y cols., 2012).

También reducen la absorción de la vitamina B₁₂ e interactúan con otros antinutrientes. Por ejemplo, la interacción entre taninos y lectinas parece reducir el efecto inhibitorio de los taninos sobre la amilasa (De Boer y Bickel, 1988) y la interacción con glicósidos cianogénos reduce los efectos deletéreos de estos últimos (Bromley, 1994).

Estos compuestos son resistentes a la degradación, por lo que es probable que permanezcan en el tracto digestivo y no sean absorbidos ni se transporten a otros tejidos (Jiménez-Ramsye y cols., 1994).

Los taninos de habas y guisantes con frecuencia se localizan en la cubierta de la semilla (Marquardt, 1989; Gatel y Grosjean, 1990), con niveles más altos de taninos en la testa más oscura que en la más clara. Del mismo modo, Deshpande y Campbell (1992) encontraron que semillas de color blanco o crema de *Lathyrus sativus* se asociaban con niveles bajos en taninos, mientras que las semillas con cubiertas más oscuras, en general tenían altos niveles de taninos. Observaciones similares con respecto a *L. sativus* fueron hechas por Urga y cols. (1995) y Wang y cols. (1998).

En las leguminosas el proceso de remojo y la cocción se utiliza para reducir compuestos fenólicos y taninos de manera significativa (Vadivel y Pugalenth, 2008).

Recientemente los compuestos fenólicos de las plantas están ganando cada vez más importancia en relación con la salud, ya que presentan propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias e hipotensas (Shetty, 1997; Ramos, 2007; Saura-Calixto y Goni, 2009; Vioque y cols., 2012). Por lo tanto, se podría sugerir que, si bien los genotipos con bajo contenido en fenoles eran preferidos cuando se buscaban atributos nutricionales, los genotipos con alto contenido en fenoles eran beneficiosos para proporcionar resistencia en cuestión de salud.

B.5. Ácido fítico.

El ácido fítico es el hexafosfato de mio-inositol, se acumula en semillas durante el período de maduración y es la principal forma de almacenamiento de fosfato e inositol en las semillas (Loewus, 2002). El fósforo, en esta forma, no

puede ser utilizado por los animales monogástricos ya que carecen de la enzima digestiva fitasa en la mucosa intestinal (Holm y cols., 2002).

Liener (1989) informó de su presencia en las semillas de leguminosas en una proporción de 1-5% del peso seco.

El ácido fítico tiene un efecto antinutricional muy relevante por su capacidad, cuando forma fitato, de unirse fuertemente a cationes, entre los cuales el calcio, magnesio, hierro y zinc tienen importancia nutricional primaria, dificultando su disponibilidad para la absorción por el epitelio intestinal (Liener, 1989; Glahn y cols., 2002; Bohn y cols., 2008).

El ácido fítico también se une a proteínas y almidón formando complejos insolubles, reduciendo así la biodisponibilidad y digestión de estos compuestos (Phillippy, 2003).

Se destruye en el rumen por lo que no es un problema nutricional para rumiantes.

En algunas semillas existe también una enzima que reduce el contenido de fitatos, la fitasa, que permite disminuir el efecto nocivo de los fitatos cuando coinciden. Esta coincidencia puede ser propiciada mediante tratamientos físicos (Liener, 1989) como por ejemplo la germinación que reduce a la mitad su contenido (D'Mello, 1995).

El fitato en la dieta puede tener efectos beneficiosos para la salud en pacientes con diabetes ya que disminuye la respuesta de glucosa en sangre reduciendo la tasa de digestión del almidón y ralentizando el vaciamiento gástrico (Thompson, 1993). Asimismo, el fitato también regula la secreción de insulina (Barker y Berggren, 1999). Se cree que el fitato reduce los coágulos de sangre, el colesterol y los triglicéridos y por lo tanto previene las enfermedades coronarias (Jariwalla y cols., 1990; Onomi y cols., 2004). También se ha

sugerido que impide el desarrollo de cálculos renales (Grases y cols., 2000a,b; Selvam, 2002). Se utiliza como un agente complejante para la eliminación de trazas de iones metálicos pesados (Wise, 1982).

B.6. Oligosacáridos.

Los oligosacáridos son carbohidratos de bajo peso molecular que contienen α -galactósidos y uniones β -fructosídicas. Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, también llamados galactooligosacáridos o α -galactósidos, son oligosacáridos solubles de bajo peso molecular cuya unidad básica es la sacarosa a la que se une galactosa formando rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Dey, 1985). A estos oligosacáridos se les considera como componentes importantes de una amplia variedad de leguminosas de grano. Estos oligosacáridos constituyen alrededor del 31-76% de los azúcares solubles totales en algunas leguminosas como el garbanzo negro (Girigowda y cols., 2006) aunque su concentración varía en las distintas especies, así como en las diferentes variedades de leguminosas de grano (Mohamed y Rayas-Duarte, 1995). Por ejemplo, en comparación con los guisantes, habas y soja, los altramuces contienen niveles relativamente altos de estaquiosa y rafinosa (Jezierny y cols., 2010). Entre las diferentes especies de *Lupinus*, un mayor aumento de contenido total α -galactósidos se han informado más en *L. albus* que en *L. angustifolius* (Cherrière y cols., 2003).

Los oligosacáridos son digeridos en el rumen pero no son digeribles para animales monogástricos, debido a la ausencia de la enzima α -galactosidasa en la mucosa intestinal (Mul y Perry, 1994; Pires y cols., 2007); son fermentados anaeróbicamente por bacterias intestinales produciendo dióxido de carbono, hidrógeno, metano y ácidos grasos de cadena corta, originando flatulencia, diarrea, dolor abdominal y pérdida de apetito (Ferguson y cols., 2003). Van Barneveld (1999), al revisar el valor nutricional de las diferentes especies de

lupino para el ganado, llegó a la conclusión de que los altos niveles de α -galactósidos podían tener una serie de efectos negativos entre los que destacaban la interferencia con la digestión de otros nutrientes en el intestino delgado (por ejemplo, con aminoácidos), una disminución de la energía neta debido a una mayor fermentación en el intestino grueso, y efectos osmóticos de α -galactósidos en el intestino delgado dando como resultado un aumento de la frecuencia de paso.

Por todos estos motivos, los altos niveles de oligosacáridos pueden afectar a la nutrición y conducir a la angustia y el malestar en los animales. Esto hace que se les considere como antinutricionales en las dietas para animales monogástricos.

En general, los oligosacáridos se sabe que también ejercen efectos "prebióticos" promoviendo la actividad beneficiosa de la microflora intestinal, lo que mejora la salud intestinal, cuando se administra en cantidades apropiadas (Gibson y Roberfroid, 1995; Williams y cols., 2001). Por ejemplo, los estudios en seres humanos adultos revelaron que un suministro diario de 2,5-10 g de fructo-oligosacáridos de cadena corta como dosis óptima y bien tolerada, conduce a un aumento significativo en la colonia de *Bifidobacteria* (Bouhnik y cols., 2006.).

Como producto de la fermentación se generan ácidos grasos de cadena corta con una alta proporción de butirato (Englyst y Cummings, 1987) que afectan a diversas funciones fisiológicas y que tienen efectos beneficiosos en la salud, tales como la reducción de la respuesta glucémica e insulinémica al alimento, un efecto hipocolesterolémico y un efecto protector contra el cáncer colon-rectal (Cassidy y cols., 1994; Asp y cols., 1996).

B.7. Saponinas.

Las saponinas son glicósidos tensioactivos de origen natural que están presentes en muchas plantas. Se caracterizan por un sabor astringente, y su efecto antinutricional se debe probablemente a un aumento en la permeabilidad de las células de la mucosa del intestino delgado que, a su vez, puede conducir a una inhibición del transporte activo de nutrientes a través de la pared intestinal (Johnsson y cols., 1982; Jain y cols., 2009). Además, son pobremente absorbidas desde el intestino, porque forman no sólo complejos insolubles con los 3- β -hidroxiesteroides, sino también grandes micelas mixtas con los ácidos biliares y el colesterol (Pusztai y cols., 2004). Las saponinas también han sido consideradas como compuestos indeseables debido a la toxicidad y su actividad hemolítica (Campos-Vega y cols., 2010).

Desde el punto de vista nutricional, es preferible un genotipo con menor contenido en saponinas ya que estas podrían retrasar el crecimiento (Golawaska, 2007).

En general, a pesar de su sabor amargo, se supone que las saponinas no restringen el consumo de alimento de los animales monogástricos; sus niveles, en la mayoría de los ingredientes de los piensos comunes, incluidas las leguminosas de grano, son más bien bajos (Huisman y Tolman, 2001).

B.8. Polisacáridos no amiláceos.

Los animales monogástricos suelen carecer de las enzimas necesarias para degradar polisacáridos no amiláceos (NSP) en el tracto digestivo, por lo que sólo pueden ser fermentados por la flora intestinal (Dabrowski y Guderley, 2002) y pueden retrasar la absorción intestinal de glucosa (Knudsen Bach, 2001).

La presencia de NSP solubles reduce la tasa de evacuación y aumenta el tiempo de residencia de la digesta en el intestino (Van der Klis y Van Voorst, 1993) pudiendo además aumentar la viscosidad del contenido del estómago (Storebakken, 1985). El NSP insoluble causa efectos opuestos (Kirwan y cols., 1974). Las pectinas y las gomas tienden a aumentar la viscosidad de la digesta en pollos, lo que reduce la digestibilidad y la absorción (Choct y cols., 1995), probablemente por la dificultad de la capacidad de las enzimas para actuar en el grueso de la digesta.

Adamidou y cols. (2009) observaron NSP total, soluble e insoluble y no desempeñaron ningún papel significativo en la digestibilidad del almidón en lubina, sin embargo, la dieta con el nivel de inclusión superior de NSP total mostró un mayor tiempo de evacuación de los intestinos y uno de los más altos valores de digestibilidad del almidón

La fracción de NSP de habas y guisantes se compone principalmente de celulosa, con niveles más bajos de la hemicelulosa (Salgado y cols., 2002b; Jezierny, 2009). Los altramuces contienen altos niveles de NSP, siendo el contenido de celulosa generalmente más alto que la hemicelulosa; también tienen una cantidad considerable de oligosacáridos (Knudsen Bach, 1997; Salgado y cols., 2002a).

B.9. Alcaloides.

Los alcaloides son aminas tóxicas de origen natural. Son producidas por las plantas, principalmente como mecanismo de defensa frente a los animales herbívoros (Wink, 1988; Kim y cols., 2007).

Dentro de las leguminosas de grano, se sabe que los altramuces contienen cantidades considerables de alcaloides (Wink y cols., 1995), mientras que las habas y los guisantes están desprovistos de ellos (Huisman y

Tolman, 2001). Los alcaloides de los altramuces frecuentemente tienen como base un anillo bicíclico de quinolizina (por ejemplo, lupinina), tricíclico (por ejemplo, angustifolina) o tetracíclico (por ejemplo, esparteína, lupanina) derivados de la quinolizidina (Wink y cols., 1995).

Los principales efectos tóxicos de los alcaloides se producen como consecuencia de las alteraciones del sistema nervioso central (produciendo convulsiones y parálisis respiratoria como resultado de la inhibición neuronal), de los procesos digestivos, de la reproducción y del sistema inmunológico (Lallès y Jansman, 1998). Los efectos anti-palatabilidad de los alcaloides de los altramuces podrían estar mediados, en parte, por los efectos neurológicos (Cheeke y Kelly, 1989).

Su efecto sobre las especies es variado. Se ha demostrado que los cerdos son susceptibles a la presencia de alcaloides en sus dietas (Godfrey y cols., 1985), sin embargo, los datos actuales relativos a la utilización de lupinos en la alimentación del cerdo son controvertidos y su nivel de tolerancia depende tanto de la cantidad total de los alcaloides de la dieta como de su origen (Kim y cols., 2007). En general, Godfrey y cols. (1985) y Allen (1998) propusieron que el contenido de alcaloides totales en las dietas para cerdos en crecimiento no debe exceder de 0,2, y 0,33 g / kg, respectivamente. En cambio su inclusión en la dieta de pollos de engorde puede llegar al 20% y en conejos al 50% sin tener efectos nocivos (Cheeke y Kelly, 1989).

B.10. Glicósidos cianógenos.

Los encontramos en semillas de leguminosas aunque no constituyen un factor antinutricional importante. Los glicósidos cianógenos son toxinas vegetales que pueden ser definidas como glicósidos de α -hidroxinitrilos que en la hidrólisis liberan cianuro de hidrógeno.

Sus efectos antinutricionales se deben a que producen una rápida hidrólisis de las β -glucosidasas vegetales o microbianas; presentan una afinidad a enzimas críticas (por ejemplo al citocromo oxidasa del sistema de transporte de electrones) lo que inhibe la respiración celular produciendo convulsiones y la muerte en dosis letales. En dosis no letales, su consumo incrementa el requerimiento de aminoácidos azufrados deficitarios en semillas de leguminosas (D'Mello, 1995).

B.11. Aminoácidos no proteicos.

D'Mello (1995) determinó que la presencia de aminoácidos no proteicos era una característica de las semillas de leguminosas. Estos aminoácidos eran análogos a los aminoácidos esenciales o a los neurotransmisores del sistema nervioso central por lo que podían producir desórdenes neurológicos y reducir su utilización como nutrientes.

Las especies de *Lathyrus* destacaban por la presencia de aminoácidos no proteicos neurotóxicos y osteotóxicos que limitaban su uso en la alimentación (Akalu y cols., 1998; Yang y cols., 2006).

En la actualidad, la atención se centra más en el desarrollo de una gran variedad de cosechas para llenar el vacío que existe entre la oferta y la demanda de las leguminosas, pero no se ha puesto demasiado énfasis en su calidad nutricional. Un estudio de la composición y de la calidad nutricional sería de gran interés, ya que permitiría seleccionar variedades y también reducir o eliminar los factores antinutricionales para poder obtener semillas de leguminosas comestibles como una fuente barata de proteínas. Este tipo de estudios también contribuiría a aumentar la disponibilidad de alimentos mediante el procesamiento de variedades infrautilizadas obteniendo formas comestibles gracias a la investigación y el desarrollo (Salunke y cols., 2006).

Mikie y cols. (2009) sugirieron que los programas de mejora de todas las leguminosas de grano debían tener como objetivo la disminución del contenido de factores antinutricionales a una medida segura. Ellos han desarrollado soja libre de Kunitz (inhibidor de la proteasa), habas sin taninos y cultivos de guisantes con bajos factores antinutricionales. Por otra parte, los avances en la mejora de plantas ofrecen la posibilidad de obtener leguminosas de grano no sólo con mayor contenido de proteínas, sino también con una mejor calidad de proteínas, especialmente en la composición y la digestibilidad de aminoácidos (Monti y Grillo, 1983; Clarke y Wiseman, 2000).

Suneja y cols. (2011) observaron una variabilidad significativa con respecto al ácido fítico, compuestos fenólicos e inhibidores de tripsina en las diferentes líneas de mejora recomendadas de garbanzo negro. El genotipo Pant U-19 tenía mayor contenido de proteínas y niveles relativamente moderados de factores antinutricionales.

Finalmente, varios métodos de procesamiento se han dispuesto para reducir o eliminar los posibles efectos negativos de los antinutrientes en leguminosas, mejorando así su valor alimenticio. Los diferentes tratamientos tradicionales, como descascarillado, remojo, cocción, fermentación y germinación se han utilizado para reducir el nivel de algunos de estos factores y mejorar la calidad nutricional de las leguminosas (Mubarak, 2005; Nergiz y Gokgoz, 2007; Shimelis y Rakshit, 2007; Martín-Cabrejas y cols., 2008). Los taninos, el ácido fítico, el inhibidor de tripsina y los oligosacáridos de mungo (Mubarak, 2005), caupí (Udensi y cols., 2007), garbanzo negro, judías rojas y blancas (Rehman y Shah, 2005) se redujeron significativamente después de la ebullición, autoclave y cocción. Sin embargo, el tratamiento térmico destruyó también algunos de los aminoácidos y vitaminas (Jain y cols., 2009). La fermentación de cereales y legumbres redujo sensiblemente su contenido de fitatos, debido a la fitasa endógena de semillas y a otros microorganismos útiles

(Sandberg y Andlid, 2002). El aumento de temperatura por infrarrojos, llamada micronización, se aplicó a los granos de cereal para mejorar su digestibilidad, reducir sus inhibidores de la tripsina y mejorar su palatabilidad para la alimentación animal (Hutton y Foxcroft, 1975). Neus y cols. (2005) observaron que la rafinosa y la estaquiosa eran estables al calor en las variedades de soja, por lo que deben ser eliminados mediante acción enzimática o gracias a la selección de genotipos deseables.

Recientemente, Pedrosa y cols. (2012) demostraron que el tratamiento controlado de caída de presión (DIC) reducía considerablemente la mayoría de los componentes antinutricionales con las ventajas de que se necesitaba un tiempo de procesamiento corto y la posibilidad de tratar todas semillas para aplicaciones industriales.

III. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.

Al plantearnos nuestro posible tema de trabajo, y analizando distintas perspectivas, llegamos a la idea de que uno de los principales problemas medioambientales en nuestra comunidad lo constituía el aumento global de suelos marginales, principalmente en la Cuenca del Duero. Son terrenos fácilmente arrastrables por haber perdido la cubierta vegetal, zonas sobreexplotadas cuya salinidad se incrementa o escarpes desnudados de vegetación por el fuego o por distintas construcciones. Teniendo en cuenta esto pensamos que un objetivo de nuestro trabajo podía estar en sentar las bases para, a largo plazo, ayudar a solucionar este problema. Consideramos que, puesto que la deficiencia en nitrógeno mineral era un importante factor limitante del crecimiento de las plantas en zonas áridas y semiáridas y la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosas es una fuente primaria del nitrógeno fijado en estas

zonas (Zahran, 1999), la utilización de leguminosas en nuestras investigaciones podría ser conveniente para después conseguir mejorar las áreas afectadas. El uso de especies leguminosas nativas sería una buena solución (Rejili y cols., 2007) para proporcionar una mejora de los suelos que presentan alteraciones. Dentro de la familia de las leguminosas, la mayor parte de las semillas anuales comercialmente importantes: soja, judía, lenteja, guisante, garbanzo, etc. son especies que muestran una disminución de su producción en suelos áridos o alterados (Zahran, 1999).

Algunas especies del género *Medicago* (*Medicago indicus*) se desarrollan bien en suelos alterados (Zahran y cols., 2007) mientras que otras, forrajeras tradicionales como la alfalfa (*Medicago sativa*), no prosperan en este tipo de suelos (Gebrehiwot y cols., 2002).

Pensamos entonces en realizar nuestros estudios con *Medicago arborea* L. que es una leguminosa caracterizada por su gran adaptación a condiciones ecológicas extremas, resistiendo la sequía y presentando semillas carentes de dormición en cualquier época del año (Corleto y cols., 1980). Las características particulares de esta especie, como su capacidad de adaptación a condiciones extremas y la ausencia de dormición, la hacían una especie muy interesante para su uso en la regeneración de suelos áridos marginales. Podría, además, representar una alternativa real a la soja en la producción de biomasa y proteínas en zonas áridas donde esta especie podría ser cultivada y utilizada como forraje en condiciones que no resistirían otras especies.

Desde el punto de vista fisiológico, *Medicago arborea* es una especie muy poco estudiada, existiendo solo referencias esporádicas de su comportamiento en cultivo *in vitro*. En estudios previos, realizados por nuestro equipo de investigación desde 1995, se han comprobado grandes diferencias

en las respuestas morfogénicas de *Medicago arborea* así como su incapacidad para germinar en condiciones naturales.

El primer objetivo de nuestro trabajo se tenía que centrar en conseguir un método de regeneración de plantas de *Medicago arborea* a través de la embriogénesis u organogénesis somática. Para ello se utilizarían distintos explantos de plántulas obtenidas en condiciones de laboratorio y distintos medios de cultivo para definir cuál era el más eficaz en la inducción y mantenimiento de los embriones u órganos. Se consideró también que una parte importante de nuestro estudio era conseguir que la mayor parte de los embriones u órganos somáticos obtenidos fueran capaces de germinar, considerar el medio con el que se obtiene el mayor porcentaje de plántulas que se transformarán en plantas vigorosas.

Pensamos también que sería interesante realizar diversos análisis para estudiar posibles marcadores de la diferenciación: Para ello pensamos en las peroxidasas y en distintos patrones isoenzimáticos (Sikimato deshidrogenasa, Malato deshidrogenasa, Enzima málico, Esterasa, Superóxidodismutasa y Fosfatasa ácida) que nos podían revelar diferencias en los callos, incluso antes de que la respuesta fuera visible.

Nuestro equipo de investigación dispone de un germoplasma de *Medicago arborea* de amplia procedencia circunmediterránea. Algunas de las accesiones proceden de zonas altamente salinizadas y en general todas crecen sobre suelos áridos o semiáridos, a los que aportan materia orgánica y fijan nitrógeno atmosférico.

Se ha llevado a cabo un estudio de la variabilidad genética de quince accesiones de esta especie. Existen claras diferencias genotípicas entre los distintos individuos considerando su origen geográfico. Las diferencias fenotípicas también son obvias entre las distintas accesiones de *M. arborea*

(número y tamaño de las hojas, porte de las plantas, presencia de estructuras que confieren protección frente a alta irradiación y pérdida de agua, etc.) cuando crecen en las mismas condiciones.

El disponer de estas accesiones, de distinta procedencia, y poseer plantas en el jardín de ingenieros agrónomos de Madrid, nos llevó a plantearnos una segunda parte del trabajo.

De entre las distintas accesiones, si queríamos considerar su interés como forrajeras, habría que analizar el valor nutritivo que podía tener cada una de ellas. Se consideró entonces importante medir, para cada accesión, los factores nutritivos (proteínas, iones y fibra) y los antinutritivos (fitina e inhibidores de α -amilasa) para después comparar todos estos elementos y ver qué variedades son las más valiosas como forrajeras.

Con las accesiones seleccionadas habría que realizar el cultivo *in vitro* de los individuos más interesantes y observar su desarrollo en el suelo para, en un futuro, estudiar su capacidad de prosperar en suelos degradados.

Los objetivos concretos del trabajo que se presenta se pueden resumir:

- 1) Regeneración de plantas de *Medicago arborea* L. a través de la embriogénesis u organogénesis somática y detección de posibles marcadores de la diferenciación.
- 2) Análisis de factores nutricionales (proteínas, fibras, iones), de 15 accesiones de *Medicago arborea* L.
- 3) Análisis de los factores antinutricionales (fitina e inhibidores de α -amilasa), de 15 accesiones de *Medicago arborea* L.

- 4) Comienzo de la regeneración por cultivo *in vitro* de los individuos mejor dotados desde el punto de vista nutricional, para su utilización como plantas forrajeras.

CONCLUSIONES

1. De los diferentes medios ensayados en el estudio de la embriogénesis somática de *M. arborea* L., los mejores resultados se han obtenido utilizando como medio de inducción el de Murashige y Skoog, siempre en presencia de auxinas y citoquininas (MSI). Las mejores respuestas se obtuvieron utilizando 2,4-D como auxina, y kinetina como citoquinina. Los explantos más inductores fueron cotiledones y peciolo, sobre todo estos últimos.
2. Para aumentar la eficiencia embriogénica, fue necesario, a partir del tercer mes y en todos los casos, traspasar los callos embriogénicos a un nuevo medio (MSII) carente de citoquininas y con la concentración de auxinas reducida a un cuarto.
3. Los embriones somáticos obtenidos pasaron por las mismas fases que los embriones cigóticos y, en todos los casos, los embriones maduros mostraron un meristemo apical y uno radicular sin conexión con el callo.
4. Los embriones somáticos obtenidos se desarrollaron normalmente y para su germinación y transformación en plántulas fue necesaria la presencia de ácido indolbutírico en el medio.
5. Podemos considerar a las peroxidasas como enzimas implicadas en la embriogénesis somática de *M. arborea* L. ya que se observa una disminución de la actividad peroxidásica soluble en los callos embriogénicos en el momento en el que comienzan a aparecer los embriones somáticos. Esta actividad siempre es menor en los callos embriogénicos que en los no embriogénicos (al contrario de lo que ocurre con las peroxidasas ligadas a pared). Se puede utilizar la isoforma de peroxidasa: L-ascorbato peroxidasa como un marcador que permitiría la identificación del potencial embriogénico en etapas tempranas del desarrollo.

6. La ausencia de algunas isoformas de esterasas pueden servir para diferenciar callos embriogénicos y no embriogénicos en *M. arborea* L.
7. Las isoformas de fosfatasa ácida no son útiles como marcadores en el estudio de la embriogénesis somática en *M. arborea* L.
8. La concentración de iones en las 15 accesiones de *M. arborea* L. estudiadas está por encima de los niveles mínimos sugeridos para la alimentación animal; solo en el caso del Al y del Na se encuentran accesiones con concentraciones muy bajas o no detectables.
9. Todas las accesiones presentan altos valores en fibras, destacando la MA_12 tanto en FND como en FAD y LAD.
10. Los valores de proteínas están por encima de los requeridos en una ingesta animal normal.
11. Las 15 accesiones de *M. arborea* L. poseen altos contenidos de iones, proteína y fibra y, por lo tanto, desde un punto de vista nutritivo, podrían considerarse como positivas por su posibilidad como forrajeras.
12. Los valores de fitina en todas las accesiones están por debajo de los encontrados para otras leguminosas.
13. Los valores de inhibidores de α -amilasa están dentro del rango de los encontrados en otros alimentos, destacando los bajos valores encontrados en hojas y peciolo de las accesiones 5 y 15, lo que hace que tengan un mayor valor como forrajeras si solo se considerara este aspecto.
14. Teniendo en cuenta todos los factores nutricionales y antinutricionales, se puede considerar a las accesiones 4, 5 y 11 como las que tienen un mayor valor alimenticio y que podrían ser utilizadas como buena fuente de forraje.
15. Los mismos medios utilizados para la inducción, producción y germinación de embriones fueron los más adecuados para la proliferación de las accesiones seleccionadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad M., Noguera P., Puchades R., Maquieira A., Noguera V. (2002) Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. *Bioresource Technol.* 82:241-245.
- Adamidou S., Nengas I., Alexis M., Foundoulaki E., Nikolopoulou D., Campbell P., Karacostas I., Rigos G., Bell G.J., Jauncey K. (2009) Apparent nutrient digestibility and gastrointestinal evacuation time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing different levels of legumes. *Aquaculture* 289:106-112.
- Agbede J.O., Aletor V.A. (2003) Evaluation of fish meal replaced with leaf protein concentrate from glyricida in diets for broiler chicks: Effect on performance, muscle growth haematology and serum metabolites. *Int. J. Poult. Sci.* 2(4):242-250.
- Agrawal V., Sardar P.R. (2007) *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43:585– 592.
- Akalu G., Johansson G., Nair B. M. (1998) Effect of processing on the content of β -N-oxalyl- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP) in grass pea (*Lathyrus sativus*) seeds and flour as determined by flow injection analysis. *Food Chem.* 62:233-237.
- Akinyede A.I., Amoo I.A., Eleyinmi A.F. (2005) Chemical and functional properties of full fat and defatted *Dioclea reflexa* seed flours. *J. Food Agric. Env.* 3:112–115.
- Akpınar N., Akpınar M.A., Türkoglu S. (2001) Total lipid content and fatty acid composition of the seeds of some *Vicia* L. species. *Food Chem.* 74:449–453.
- Alegre J., Sobrino E., Guerrero A., Tenorio J.L., de Andrés E.F., Ceresuela J.L., Ayerbe L. (1998) Una alternativa para el mundo del tercer milenio. *Actas del III Congreso de la Sociedad española de Agricultura ecológica SEAE.* Valencia.

- Alkhateeb A.A. (2006) Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. *Biotechnol.* 5:466–470.
- Allen J.G. (1998) Toxins and lupinosis. In: Gladstones, J.S., Atkins, C., Hamblin, J. (Eds.), *Lupins as Crop Plants. Biology, Production and Utilization*. CAB International, Wallingford, pp. 411–435.
- Alonso R., Orue E., Marzo F. (1998) Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chem.* 63:505-512.
- Alonso R., Aguirre A., Marzo F. (2000) Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.* 68:159-165.
- Amberger, L.A., Shoemaker, R.C., Palmer, R.G. (1992) Inheritance of two independent isozyme variants in soybean plants derived from tissue culture. *Theor. Appl. Gen.* 84:600- 607.
- Ammar H., López S., González J.S., Ranilla M.J. (2004) Seasonal variations in the chemical composition and in vitro digestibility of some Spanish leguminous shrub species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:327–340.
- Ammar H., López S., González J.S. (2005) Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by *in vitro* techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:323–331.
- Anandan R., Sudhakar P., Balasubramanian P., Gutieřrez-Mora A. (2012) *In vitro* somatic embryogenesis from suspensión cultures of *Carica papaya* L. *Scientia Horticult.* 136:43-49.
- Anbazhagan V., Ganapathi A. (1999) Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 56:179-184.

- Andrieu J., Demarquilly C., Sauvant D. (1988) Tablas del valor nutritivo de los alimentos. En: Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos: 318-407. INRA publ. Versión española traducida por J. González-Cano. Mundi-Prensa, Madrid.
- Anwar N., Kikuchi A., Watanabe K.N. (2010) Assessment of somaclonal variation for salinity tolerance in sweet potato regenerated plants. *Afr. J. Biotechnol.* 9(43):7256-7265.
- AOAC. (1990) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition, Arlington, Virginia (USA).
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–399.
- Ara H., Jaiswal U., Jaiswal V.S. (1999) Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). *Plant Cell Rep.* 19(2):166–70.
- Ara H., Jaiswal U., Jaiswal V.S. (2000) Synthetic seeds: prospects and limitations. *Curr. Sci.* 78:1438–1444.
- Aranda P., Dostalova J., Frias J., Lopez-Jurado M., Kozłowska H., Pokorný J., Urbano G., Vidal-Valverde C., Zdyunczyk Z. (2001) Nutrition. In CL Hedley, ed, Carbohydrates in Grain Legume Seeds. Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics. CAB International, Wallingford, UK, pp 61–87.
- ARC (1980) The nutrients requirements of ruminant livestock. Agricultural Research Council 4th edition pp. 73-310. CAB International, Wallingford.
- Aregheore E.M. (2002) Kiribati: country pasture/forage resource profiles. The University of the South Pacific, School of Agriculture, Alafua Campus, Apia, Samoa.
- Aregheore E.M., Hunter D. (1999) Crude protein and mineral composition of samoan ruminant forage. *J. South Pacific Agric.* 6(1):35-39.

- Ashok K.H.G., Murthy H. N., Pack K. Y (2003) Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Cucumis sativus* L., Scientia Hortic. 98(2):213-222.
- Ashraf M.Y., Khan A.H., Azmi A.R. (1992) Cell membrane stability and its relation with some physiological processes in wheat. Acta Agron. Hung. 41(3-4):183-191.
- Asp N.G., van Amelsvoort J.M.M., Hautvast J.G.A.J. (1996) Nutritional implications of resistant starch. Nutr. Res. Rev. 9:1–31.
- Atwal A.S., Eskin N.A.M., McDonald M.E., Vasey-Genser M. (1980) The effects of phytate on nitrogen utilization and zinc metabolism in young rats. Nutr. Rep. Int. 21:257– 267.
- Awad V., Shirke R., Mukherjee S., Khadke S., Pawar P., Meti N., Harsulkar A. (2011) Somatic embryogenesis, regeneration and *in vitro* production of glycyrrhizic acid from root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47(4):525-535.
- Aydin Y., Ipekci Z., Talas-Ogras T. (2004) High frequency somatic embryogenesis in cotton. *Biol. Plant.* 48: 491–495.
- Bach Knudsen K.E. (1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:319–338.
- Bagnoli F., Capuana M., Racchi M.L. (1998) Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:909–913.
- Bajaj Y.P.S. (1995). Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed*. Springer, Berlin, pp. 105–125.

- Balen B., Krsnik-Rasol M., Simeon-Rudolf V. (2003) Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. J. Plant Physiol. 160:1401–1406.
- Balen B., Pavokovic D., Peharec P., Krsnik M. (2009). Biochemical markers of morphogenesis in long term horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gillib.) tissue culture. Scientia Horticult. 119: 88–97.
- Bapat S.A., Rawal S.K., Mascarenhas A.F. (1992) Isozyme profiles during ontogeny of somatic embryos in wheat (*Triticum aestivum* L). Plant Sci. 82:235–242.
- Barba F., Soler A, Varea J. (1976) Anodic electrogeneration of a stable biradical. Tetrahedron Lett. 557-560.
- Barker C.J., Berggren P. (1999) Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus secretion coupling. Anticancer Res. 19:3737–3742.
- Barry-Etienne D., Bertrand B., Schlönvoigt A., Etienne H. (2002) The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects their regeneration and the development of plants in the nursery. Plant Cell Tiss.Organ Cult. 68:153-162.
- Bastianelli D., Grosjean F., Peyronnet C., Duparque M., Régnier J.M. (1998) Feeding value of pea (*Pisum sativum* L.). 1. Chemical composition of different categories of pea. Anim. Sci. 67:609–619.
- Beck P.A., Hutchison S., Gunter S.A., Losi T.C., Stewart C.B., Capps P.K., Phillips J.M. (2007) Chemical composition and in situ drymatter and fiber disappearance of sorghum sudangrass hybrids. J. Anim. Sci. 85:545–555.
- Begbie R., Ross A.W. (1993) Resistance of the kidney bean reserve protein, phaseolin, to proteolysis in the porcine digestive tract. J. Sci. Food Agric. 61:301–307.
- Bell G., Janssen A.E.M., Halling P.J. (1997) Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion

- of water concentrations and activities. *Enzyme and Microbial Technol.* 20:471-477.
- Belmonte M.F., Donald G., Reid D.M., Yeung E., Stassolla C. (2005) Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). *J. Exp. Bot.* 56:2355–2364.
- Benelli C., Fabbri A., Grasi S., Lambardi M., Rugini E. (2001) Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76:112-119.
- Berezin I., Mizrachy-Dagry T., Brook E., Mizrahi K., Elazar M., Zhou S., Saul-Tcherkas V., Shaul O. (2008) Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to Mg^{2±}, Zn^{2±}, and Cd^{2±} ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size. *Plant Cell Rep.* 27:939–949.
- Bergmeyer H.U., Bernt E., Grassl M., Michael G. (1974) Evaluation of experimental results. In: *Method of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (Ed.). Verlag, Chemie, Weinheim, Academic Press, London, pp. 309-317.
- Bernard S.M., Habash D.Z. (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol.* 182:608–620.
- Bewley J.D., Black M. (1994) *Seeds-physiology of development and germination*. New York: Plenum Press, 1-33.
- Bézar J., Blond J.P., Bernard A., Clouet P. (1994) The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod. Nutr. Dev.* 34:539–568.
- Bian F.H., Qu F.N., Zheng C.X., You C R., Gong X.Q. (2007) Recent advances in *Cyclamen persicum* Mill. somatic embryogenesis. *Northern Horticult.* 8:70-72.

- Binarova P., Dolezel J. (1993) Effect of anti-microtubular drug amiprophos-methyl on somatic embryogenesis and DNA ploidy levels in alfalfa and carrot cell suspension cultures. *Biol. Plant.* 35:329-339.
- Bio-Rad Laboratoires (1977) Colorimetric protein assays. Bio-Rad Laboratoires. USA.
- Bischoff H., Puls W., Krause H. P., Schutt H., Thomas G. (1985) Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAYm1099 (miglitol) and BAY o 1248. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1:53-62.
- Blair R. (2007) Nutrition and Feeding of Organic Pigs. CAB International, Wallingford, pp. 110-119.
- Blázquez S., Olmos E., Hernández J.A., Fernández-García N., Fernández J.A., Piqueras A. (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 97:49-57.
- Bogre L., Stefanov I., Abraham M., Somogyi I., Dudits D. (1990) Differences in the responses to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment between embryogenic and non-embryogenic lines of alfalfa. In: Nijkamp HJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 427-436.
- Bohn L., Meyer A.S., Rasmussen S.K. (2008) Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9(3):165-191.
- Bouazza A., Rambour S., Gaspar T., Legrand B. (1993) Peroxidases during the course of callusing and organ differentiation from root explants of *Cichorium intybus*. *Biol. Plant.* 35:481-489.
- Bouhnik Y., Raskine L., Simoneau G., Paineau D., Bornet F. (2006) The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal

- bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr. J.* 5:8.
- Bozhkov P.V., Filonova L.H., von Arnold S. (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and its associated with cell death and extracellular acidification. *Biotech. Bioeng.* 77:658-667.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Brenes A., Jansman A.J.M., Marquardt R.R. (2004) Recent progress on research on the effects of antinutritional factors in legume and oil seeds in monogastric animals. In: Muzquiz, M., Hill, G.D., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M., Burbano, C. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oil Seeds*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 195–217.
- Brewer G.J., Sing C.F. (1970) *An introduction to isozyme techniques*. London: Academic Press.
- Bromley P. J. (1994) The role of gastric evacuation experiments in quantifying the feeding rates of predatory fish. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 4:36-66.
- Brown D.C.W., Finstad K.I., Watson E.M. (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: Thorpe, TA. (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer, Dordrecht, pp. 345–415.
- Bruinenberg M.H., Valk H., Korevaar H., Struik P.C. (2000) Factors affecting digestibility of temperate forages from semi natural grasslands: a review. *Grass and Forage Sci.* 57:292–301.
- Burbano C., Muzquiz M., Ayet G., Cuadrado C., Pedrosa M.M. (1999) Evaluation of antinutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*. *J. Sci. Food Agric.* 79:1468–1472.

- Burris J.N., Mann D.G.J., Joyce B.L., Stewart C.N. Jr. (2009) An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Bioenerg. Res.* 2:267–274.
- Burza W, Malepszy S. (1995) *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. XVIII. Plants from protoplasts through direct somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 41: 259–266.
- Campion B., Sparvoli F., Doria E., Tagliabue G-, Ga-lasso I., Fileppi M., Bollini R., Nielsen E. (2009) Isolation and characterisation of an LPA (Low Phytic Acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Gen.* 118:1211-1221.
- Campos-Vega R., Loarca-Pina G., Oomah B. D. (2010) Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res. Int.* 4:461–482.
- Cangahuala-Inocente G.C., Dal Vesco L.L., Steinmacher D., Torres A.C., Guerra M.P. (2007) Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. *Sci. Hortic.* 111:228–234.
- Canhoto J.M., Ludovina M., Guimaraes S. (1990) *In vitro* induction of haploid, diploid and triploid plantlets by anther culture of *Lochroma warscewiczii* Regel. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 21:171-177.
- Canhoto J.M., Rama S.C., Cruz G.S. (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42:514–519.
- Canibe N., Bach Knudsen K.E. (2002) Degradation and physicochemical changes of barley and pea fibre along the gastrointestinal tract of pigs. *J. Sci. Food Agric.* 82:27–39.

- Capelo A.M., Silva S., Brito G., Santos C. (2010) Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 103:237–242.
- Carbonaro M., Grant G., Cappelloni M., Pusztai A. (2000) Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *J. Agric. Food Chem.* 48:742–749.
- Carlberg I., Jonsson L., Bergenstrahle A., Soderhall K. (1987) Purification of a trypsin inhibitor secreted by embryogenic cells. *Plant Physiol.* 84:197-200.
- Carman, J.G. (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behaviour. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26:746–753.
- Casler M.D., Jung H-Jg. (2006) Relationships of fibre, lignin and phenolic to *in vitro* fibre digestibility in three perennial grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125(1, 2):251-161.
- Cassidy A., Bingham S.A., Cummings J.H. (1994) Starch intake and colorectal cancer risk: and international comparison. *Br. J. Cancer* 69:937-942.
- Castellas J. (1962) El género *Medicago* L. en España. *Collectanea Botanica* 6:183-291.
- Castillo B., Smith M.A.L. (1997) Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Rep.* 16:385-388.
- Cavalcante J.M., Sihachakr D., Allot M., Tizroutine S., Mussio I., Servaes A., Ducreux G. (1994) Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). *Plant Cell Rep.* 13:437-441.
- Chai M., Jia Y., Chen S., Gao Z., Wang H. (2011) Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104:187–192.

- Champ M.M.J. (2002) Non-nutrient bioactive substances of pulses. Br. J. Nutr. 88(3):S307–S319.
- Chandna M., Matta N.K. (1994) Studies on changing protein levels in developing and germinating seeds of *Lathyrus sativus* L. J. Plant Biochem. Biotechnol. 3:59-61.
- Chang K.C., Satterlee L.D. (1981) Isolation and characterization of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 46:1368–1373.
- Chang Y.F., Wong J.R. (1994) Regeneration of plants from protoplasts of *Triticum aestivum* L. (wheat). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Plant Protoplasts and Genetic Engineering. V. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag. v. 29, p. 161- 171.
- Chasan R. (1992) Developing somatic embryos. The Plant Cell 4:367-368.
- Chawla H.S. (1988) Isozyme modifications during morphogenesis of callus from barley and wheat. Plant Cell Tiss. Org Cult. 12:299-304.
- Cheeke P.R., Kelly J.D. (1989) Metabolism, toxicity and nutritional implications of quinolizidine (lupin) alkaloids. In: Huisman, J., van der Poel, A.F.B., Liener, I.E. (Eds.), Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, pp. 189–201.
- Chen A.H., Yang J.L., Niu Y.D., Yang C.P., Liu G.F., Li C.H. (2010) High frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA₃, and BA on somatic embryo development. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 102:357–364.
- Chen J., Luthe D.S. (1987) Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. Plant Sci. 48:181-188.

- Chen J.T., Chang W.C. (2000). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Sci.* 160(1):87-93.
- Cheong E.J., Pooler M.R. (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Rep.* 22:810– 815.
- Cherrière K., Albar J., Noblet J., Skiba F., Granier R., Peyronnet C. (2003) Utilisation of white and blue lupins in weaned piglet diets./Utilisation du lupin bleu (*Lupinus angustifolius*) et du lupin blanc (*Lupinus albus*) par les porcelets en post sevrage. *J. Rech. Porcine en France* 35:97–104.
- Chethan S., Sreerama Y. N., Malleshi N. G. (2008) Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. *Food Chem.* 111:187-191.
- Chibbar R.N., Schyluk J., Georges F., Mallard C.S., Constabel F. (1988). Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *J. Plant Physiol.* 133:367–370.
- China E. (2008) Leguminosas arbustivas endémicas de Canarias. Interés como recurso forrajero y para la conservación del suelo. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna.
- Chitra Devi B., Narmathabai V. (2011) Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106:409-418.
- Choct M., Hughes R.J, Trimble R.P., Angkanaporn K., Annison G. (1995) Non-starch polysaccharide degrading enzymes increase the performance of broiler chickens fed wheat of low apparent metabolizable energy. *J. Nutr.* 125:485-492.
- Choudhury A., Maeda k., Murayama R., Dimagno E.P. (1996) Character of a wheat amylase inhibitor, preparation and effects on fasting human pancreaticobiliary secretions and hormones. *Gastroenterology* 111:1313-1320.

- Chugh A., Khurana P. (2002) Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. *Curr. Sci.* 86:715–730.
- Chung H.H., Chen J.T., Chang W.C. (2007) Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biol. Plant.* 51(2):346-350.
- Clarke E.J., Wiseman J. (2000) Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content. *J. Agric. Sci.* 134:111–124.
- Conde P., Loureiro J., Santos C. (2004) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Rep.* 22:632-639.
- Conejero V., Semancik J.S. (1977) Analysis of the proteins in crude plant extracts by polyacrylamide slab gel electrophoresis. *Phytopathology* 67:1424-1426.
- Coppens L., Dewitte D. (1990) Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis. *Plant Sci.* 67:97-105.
- Cordewener J., Booij H., Vander Zett H., Van Engelen F., VanKammen A., deVries S.C. (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* 184: 478–486.
- Corleto A., Venezian M.E., Magini L., Eroli A., Cordella S. (1980) Proveddi addattamento e produzione di arbusti da pascolo in diverse località della Puglia e della Basilicata. *Rivista di Agron.* 14, pp 42-49.
- Corley R.H.V., Lee C.H., Law L.H., Wong C.Y. (1986) Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter* 62: 233-240.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L. (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in Tomato. *J. Exp. Bot.* 57 (3):581-588.

- Corredoira E., Ballester A., Vieitez A.M. (2003) Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Ann. Bot.* 92:129-136.
- Correia S., Cunha A.E., Salgueiro L., Canhoto J.M. (2012) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 109:143–152.
- Cowieson A.J., Ravindran V. (2007) Effect of phytic acid and phytase on the flow and composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *Br. J. Nut.* 98:745-752.
- Crépon K., Marget P., Peyronnet C., Carrouée B., Arese P., Duc G. (2010) Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Res.* 115:329–339.
- Cvikrová M., Hrubcová M., Vagner M., Machackova I., Eder J. (1994) Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) embryogenic culture after ethphone treatment. *Physiol. Plant.* 91:226–233.
- Dabrowski K., Guderley H. (2002) Intermediary metabolism. Pages 309-365 in: *Fish Nutrition*, 3rd Ed. J. E. Halver and R. W. Hardy, eds. Elsevier Science: New York.
- Dai J.L., Tan X., Zhan Y.G., Zhang Y.Q., Xiao S., Gao Y., Xu D.W., Wang T., Wang X.C., You X.L. (2011) Rapid and repetitive plant regeneration of *Aralia elata* seem via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104:125–130.
- David A. (1987) Conifer protoplasts. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Eds.) *Specific Principles and Methods: Growth and Developments*. *Cell Tiss. Cult. Forestry* 2:2-15.
- Davidsson L., Galan P., Kastenmayer .P, Cherouvrier F., Juillerat M.A., Jercberg S., Hurrell R.F. (1994) Iron bioavailability studied in infants: The

- influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatric Res.* 36:816–822.
- Dayler C.S.A., Mendes P.A.M., Prates M.V., Bloch C., Franco O.L., Grossi-de-Sa M.F. (2005) Identification of novel alpha amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Lett.* 579:5616–5620.
- De Boer F., Bickel H. (1988) *Livestock feed resources and feed evaluation in Europe.* Elsevier Sciences: Amsterdam.
- De Jong A.J., Schmidt E.D., de Vries S.C. (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 22:367–377.
- De March G., Grenier E., Miannay N., Sulmont G., David H., David A. (1993) Potential of somatic embryogenesis in *Prunus avium* immature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 34:209-215.
- Debnath C.S. (2009) A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 45:122-128.
- Degussa A.G. (2006) In: *Amino Dat 3.0. The amino acid composition of feedstuffs.* 5th rev. ed., Degussa AG, Feed Additives, Hanau, Germany.
- Deshpande S.S., Campbell C.G. (1992) Genotype variation in BOAA, condensed tannins, phenolics and enzyme inhibitors of grass pea (*Lathyrus sativus*). *Can. J. Plant Sci.* 72:1037-1047.
- Deshpande S.S., Cheryan M. (1984) Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on α -amylase activity. *J. Food Sci.* 49:516–524.
- Deshpande S.S., Damodaran S. (1990) *Food legumes: chemistry and technology.* *Adv. Cereal Sci. Technol.* 10:147-241.
- Dewald S.G., Wang X.F. (1989) Optimization of mango somatic embryogenesis. *Tropical Crops Translation Series* 1:25-29.

- Dey P.M. (1985) D-Galactose containing oligosaccharides. In: Dey, P.M., Dixon, R.A. (Eds.), *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*. Academic Press, London, pp. 53–129.
- Dhekney S., Li Z., Gray D. (2011) Factors influencing induction and maintenance of *Vitis rotundifolia* Michx. embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 105:175–180.
- Dhindsa P.L.P., Dhindsa R.S., Thrope T.A. (1979) Non-autotrophic CO₂ fixation during shoot formation in tobacco callus. *J. Exp. Bot.* 30:759–776.
- Dhindsa R.S., Beasley C.A., Ting I.P. (1975) Osmoregulation in cotton fiber. *Plant Physiol.* 56:394–398.
- Di-Vaio C., Petito A., Buccheri M. (2001) Effect of girdling on gas exchanges and leaf mineral content in the “independence” nectarine. *J. Plant Nutr.* 24:1047-1060.
- Dias S.C., Franco O.L., Magalhães C.P., de Oliveira-Neto O.B., Laumann R.A., Figueira E.L.Z., Melo F.R., Grossi-de-Sá M.F. (2005) Molecular cloning and expression of an α -amylase inhibitor from rye with potential for controlling insect pests. *Protein J.* 24:113–123.
- Dijak M., Smith D.L., Wilson T.J., Brown D.C.W. (1986) Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplast of *Medicago sativa*. *Plant Cell Rep.* 5:468-470.
- D’Mello J.P.F. (1995) Anti-nutritional substances in legume seeds. In: D’Mello, J.P.F., Devendra, C. (Eds.), *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. CAB International, Wallingford, pp. 135–172.
- Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493–1509.
- Dost M., Hussain A., Khan S., Bhatti M.B. (1990) Locational differences in forage yield and quality of maize cultivars. *Pak. J. Ind. Res.* 33:454-456.

- Driver D., Kuniyuk D. (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortSci. 19:507-509.
- Dubois T., Guedira M., Dubois J., Vasseur J. (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker? Ann. Bot. 65:539-545.
- Duc G., Marget P., Esnault R., Le Guen J., Bastianelli D. (1999) Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba*): Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. J. Agric. Sci. 133:185–196.
- Dudits D., Bogre L., Gyorgyey J. (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. J. Cell Sci. 99:475–484.
- Duke J.A. (1981) Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York.
- Dutta-Gupta S., Conger B.V. (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of switchgrass. Crop. Sci. 39:243-247.
- Dutta-Gupta S., Datta S. (2003). Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. Biol. Plant. 47:179–183.
- Eapen S., George L. (1993) Somatic embryogenesis in peanut: influence of growth regulators and sugars. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 35:151-156.
- Egertsdotter U. (1999) Somatic embryogenesis in *Picea* suspension cultures. In: Hall RD (ed) Methods in molecular biology, vol 11. Plant cell culture protocols. Humana Press, Totowa, N.J., pp 51–60.
- Englyst H.N., Cummings J.H. (1987) Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. Am. J. Clin. Nutr.45:423-431.

- Englyst H.N., Kingman S.M., Cummings J.H. (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46(2):S33-S50.
- Erbas M., Certel M., Uslu M.K. (2005) Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chem.* 89:341–345.
- Evans D.A. (1989). Somaclonal variation genetic basis and breeding applications. *Trends Genet.* 5:46-50.
- Everett N.P., Wach M.J., Ashworth D.J. (1985) Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Sci.* 41:133-140.
- Ezura H., Oozawa K. (1994) Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L). *Plant Cell Rep.* 14:107-111.
- Ezura H., Amagai H., Kikuta I., Kubota M., Oosawa K. (1995) Selection of somaclonal variants with low-temperature germinability in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep.* 14:684-688.
- Facchini P.J., Loukanina N., Blanche V. (2008) Genetic transformation via somatic embryogenesis to establish herbicide-resistant opium poppy. *Plant Cell Rep.* 27:719–727.
- FAO/WHO/UNU. (1985) Energy and protein requirements. Technical report series N° 724, Geneva.
- Feher A., Pasternak T.P., Dudits D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74:201–228.
- Feirer R.P., Simon P.W. (1991) Biochemical differences between carrot inbreds differing in plant regeneration potential. *Plant Cell Rep.* 10:152-155.
- Feng, D.L., Li, W., Li, J., Li, P.T., Zhao, M., Zhao, S.G., Shi, B.S., Peng, W.X. (2009) Observation of somatic embryogenesis and histology in *Koeleruteria*

- bipinnata* Franch var *integrifoliola*. *Chen. Plant Physiol. Commun.* 45 (9):855–858.
- Ferguson N.S., Gous R.M., Iji P.A. (2003) Determining the source of anti-nutritional factor(s) found in two species of lupin (*L. albus* and *L. angustifolius*) fed to growing pigs. *Livest. Prod. Sci.* 84:83–91.
- Fernandez S., Michaux-Ferriere N., Coumans M. (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Growth Regul.* 28:147-155.
- Fernando J.A., Vieira M.L.C., Geraldi I.O., Gloria B.A.D. (2002) Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. *Brasil Archives Biol. Tecno.* 45:277-286.
- Ferrer M.A., Calderón A.A., Muñoz R., Ros Barceló A. (1990) 4-Methoxy - α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochem. Anal.* 1:63-69.
- Fileppi M., Galasso I., Tagliabue G., Daminati M.G., Campion B., Doria E., Sparvoli F. (2010) Characterisation of structural genes involved in phytic acid biosynthesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol. Breed.* 25:453-470.
- Filonova, L.H., Bozhkov, P.V., Von Arnold, S. (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264.
- Finch R.P., Lynch P.T., Jotham J.P., Cocking, E.C. (1991) Isolation, culture, and fusion of rice protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) *Rice. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin, Springer-Verlag. v. 14, p. 251-268.
- Forster I., Higgs D.A., Dosanjh B.S., Rowshandeli M., Parr J. (1999) Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein

- concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 118C fresh water. *Aquaculture* 179:109–125.
- Fourré, J.L., Berger, P., Niquet, L., Andre, P. (1997) Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Gen.* 94:159-169.
- Fowler M.W. (1974) Role of the malic enzymes reaction in plant roots. Utilization of (2, 3-¹⁴ C) malate and (1-¹⁴ C) pyruvate by pea root apices and measurement of enzyme activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 372:245–254.
- Franco O.L., Ridgen D.J., Melo F.R., Bloch C. Jr., Silva C.P., Grossi-de-Sa M.F. (2000) Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylase inhibitors and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267:2166–2173.
- Franco O.L., Ridgen D.J., Melo F.R., Grossi de Sa M.F. (2002) Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269:397–412.
- Fransz P.F., Ruijter N.C.A., Schel J.H.N. (1989). Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 8:67-70.
- Fransz P.F., Schel J.H.N. (1991) Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* 69:26-33.
- Fry S.C. (1990) Roles of the primary cell wall in morphogenesis. In: *Progress in plant cellular and molecular biology*, pp. 504-513, H.J.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas, J. van Aartrijk, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Funatsuki H., Kihara M., Takahashi S., Lazzeri, P.A., Lörz H. (1996) Regeneration of plants from protoplasts of *Hordeum vulgare* (barley). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin, Springer- Verlag. v. 38, p. 64-78.

- Gallego P., Hita O., Villalobos N., Dorado A., Martín L., Guerra H. (2001) Somatic embryogenesis and plant regeneration with *Medicago arborea* L. plantlets. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 37:199-203.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Ganesh Kumari K., Ganesan M., Jayabalan N. (2008) Somatic organogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. *Biol. Plant.* 52 (1):17-25.
- García H.E., Peña V.C. (1995) La pared celular: componente fundamental de las células vegetales. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 75.
- García Criado B. (1974) Fraccionamiento químico de alimentos forrajeros y su evaluación por métodos de laboratorio. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- García Criado B., García Ciudad A., Rico Rodríguez M., García Carabias M.S. (1986) Composición químico-bromatológica de la alfalfa deshidratada destinada al comercio exterior. Actas de la XXVI Reunión Científica de la SEEP. Oviedo, 71-87.
- Garg L., Bhandari N.N., Rani V., Bhojwani S.S. (1996) Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Rep.* 15:855-858.
- Garin E., Grenier E., Grenier-de-March G. (1997) Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 48:83-91.
- Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Greppin H. (1982) Peroxidases 1970–1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva.
- Gaspar T., Kevers C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 32:272–289.

- Gatehouse A.M.R., Hilder V.A., Powell K.S., Wang M., Davidson G.M., Gatehouse L.N., Down R.E., Edmons H.S., Boulter D., Newell C.A., Merryweather A., Hamilton W.D.O., Gatehouse J.A. (1994) Insect resistant transgenic plants. Choosing the gene to do the job. *Biochem. Soc. Trans.* 4:944–949.
- Gatehouse J.A. (2011) Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 12(5):409–416.
- Gatel, F. (1994) Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:317–348.
- Gatel F., Grosjean F. (1990) Composition and nutritive value of peas for pigs: a review of European results. *Livest. Prod. Sci.* 26:155–175.
- Gebrehiwot L., Beuselinck P.R., Roberts C.A. (2002) Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agron. J.* 94:1059-1065.
- Germana M.A. (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Citrus aurantium* and *C. reticulata*. *Biologia* 58:843–850.
- Ghanti S.K., Sujata K.G., Rao S.M., Udayakumar M., Kavi Kishor P.B. (2009) Role of enzymes and identification of stage-specific proteins in developing somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 45:667–672.
- Ghanti S.K., Sujata K.G., Rao S.M., Kishor P.B.K. (2010). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. *Biol. Plant.* 54 (1):121–125.
- Ghazanfar S., Latif A., Hussain Mirza I., Nadeem M.A. (2011) Macro-Minerals concentrations of major fodder tree leaves and shrubs of district Chakwal, Pakistan. *Pak. J. Nut.* 10(5):480-484.

- Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401–1412.
- Gilani G. S., Cockell K. A., Sepehri E. (2005) Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 88:967–987.
- Gill C. (1997) World feed panorama. High cost of feedstuffs: global impact, response. *Feed Intern.* 18:6–16.
- Gilroy S., Bethke P.C., Jones R.L. (1993) Calcium homeostasis in plants. *J. Cell Sci.* 106:453-462.
- Giri A.P., Kachole M. (1998) Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds. *Phytochem.* 47:197–202.
- Girigowda K., Peterbauer T., Mulimani V. H. (2006) Isolation and structural analysis of ajugose from *Vigna mungo* L. *Carbohydrate Research* 341:2156–2160.
- Glahn R.P., Wortley G.M., South P.R., Miller D.D. (2002) Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid and ZnCl₂: studies using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.* 50:390–395.
- Gmitter F.G. Jr., Ling X.B., Cai C.Y., Grosser J.W. (1991) Colchicine-induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos and regenerated plantlets. *Plant Sci.* 74:135-141.
- Godfrey N.W., Mercy A.R., Emms Y., Payne H.G. (1985) Tolerance of growing pigs to lupin alkaloids. *Aust. J. Exp. Agric.* 25:791–795.
- Goelema J.O., Smits A., Vaessen L.M., Wemmers A. (1999) Effects of pressure toasting, expander treatment and pelleting on *in vitro* and *in situ* parameters of protein and starch in a mixture of broken peas, lupins and faba beans, lupins and faba beans. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:109–126.

- Goering M.K., Van Soest P.J. (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agricultural Handbook n° 379. Washington D.C.; Agricultural Research Services, USDA.
- Golawaska S. (2007) Deterrence and toxicity of plant saponins for the aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris. J. Chem. Ecol. 33:1598–1606.
- Goldberg R., Imberty A., Liberman M., Prat R. (1986) Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. In: Greppin H.; Penel C.; Gaspar T. (eds) Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva Press, Geneva, Switzerland, pp 208–220.
- Gomes da Cunha A., Fernandes-Ferrereira M. (1996) Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 47:1-8.
- Gong H.J., Randall D.P., Flowers T.J. (2006) Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow. Plant Cell Environ. 29:1970–1979.
- González G.A., Pacheco M.G., Oneto C.D., Etchart V.J., Kandus M.V., Salerno J.C., Eyherabide G., Presello D., Lewi D.M. (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. Electronic J. Biotechnol. 15(1).
- González J.M., Jove N. (2000) Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. Cer. Res. Comm. 28:65-72.
- González J.M., Friero E., Jove N. (2001) Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desfc. Cultivars. Plant Breed. 120:513-517.
- González-Andrés F., Ceresuela J.L. (1998) Chemical composition of some Iberian Mediterranean leguminous shrubs potentially useful for forage in seasonally dry areas. NZ J. Agric. Res. 41:139-147.

- González-Andrés F., Ortiz J.M. (1996) Potential of *Cytisus* and allied genera (Genisteae; Fabaceae) as forage shrubs. 1. Seed germination and agronomy. NZ J. Agric. Res. 39:205–213.
- González-Soto R.A., Sánchez-Hernández L., Solorza-Feria J., Núñez- Santiago C., Flores-Huicochea E., Bello-Perez L A. (2006) Resistant starch production from non-conventional starch sources by extrusion. Food Sci. Technol. Int. 12:5-11.
- Gonul R., Kayar A., Bilal T., Erman O.R.M., Parkan D.V.M., Dodurka H.T., Gulyasar T., Barutcu B. (2009) Comparison of mineral levels in bone and blood serum of cattle in Northwestern Turkey. J. Anim. Vet. Adv. 8:1263-1267.
- Gorbatenko O., Hakman I. (2001) Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. Int. J. Plant Sci. 162:1211–1218.
- Grant R.J., Haddad S.G., Moore K.J., Pedersen J.F. (1995) Brown midrib sorghum silage for midlactation dairy cows. J. Dairy Sci. 78:1970–1980.
- Grases F., Prieto R.M., Simonet B.M., March J.G. (2000a) Phytate prevents tissue calcifications in female rats. BioFactors 11:171–177.
- Grases F., March J.G., Prieto R.M., Simonet B.M., Costa-Bauzá A., García-Raja A., Conte A. (2000b). Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. Scandinavian J. Urol. Nephrol. 34:162–164.
- Gray D.J. (1995) Somatic embryogenesis in grape. In: Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. eds. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer, Dordrecht, pp. 191–217.
- Gray D.J., Purohit A. (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Crit. Rev. Plant Sci. 10:33-61.

- Gray D.J., Compton M.E., Harrell R.C., Cantliffe D.J. (1995) Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag. V. 30, p. 126-151.
- Grotz N., Guerinof M.L. (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1763:595–608.
- Grunes D.L., Welch R.M. (1989) Plant contents of magnesium, calcium and potassium in relation to ruminant nutrition. *J. Anim. Sci.* 67:3485-3494.
- Guan Q., Guo Y., Wei Y., Meng F., Zhang Z. (2010) Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast fusion. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 102:279-284.
- Guéguen J., Azanza J.L. (1985) Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines végétales: a. Composition et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In: Godon, B. (Ed.) *Protéines Végétales* pp 135-159.
- Guevin T.G.; Kirby E.G. (1997) Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 49:219–222.
- Guilbault G.G., Kramer D.N. (1964) Methoxy- α -naphthol as a spectrophotometric reagent substrate for measuring peroxidatic activity. *Anal. Chem.* 36(13):2494–2496.
- Guimãraes-Beelen B., Berchielli T.T., Beelen R., Medeiros A.N. (2006) Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. *Small Rumin. Res.* 61:35–44.
- Gupta Y.P. (1987) Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. *Plant Foods Hum. Nut.* 37:201–228.

- Gutiérrez E., Gallego P., Alonso A., Blázquez A., Martín L., Fernández J., Domínguez L., Rioja C., Guerra H., Villalobos N. (2010) Nitrogen compounds in embryogenic and non-embryogenic calluses of *Medicago arborea* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46:257–264.
- Guttieri M.J., Bowen D., Dorsch J.A., Raboy V., Souza E. (2004) Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 44:418–424.
- Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* 111:69–92.
- Haccius B. (1978) Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74–81.
- Hambidge K.M., HuVer J.W., Raboy V., Grunwald G.K., Westcott J.L., Sian L., Miller L.V., Dorsch J.A., Krebs N.F. (2004) Zinc absorption from low-phytate hybrids of maize and their wild-type isohybrids. *Am. J. Clin. Nut.* 79:1053–1059
- Han Y.M., Yang F., Zhou A.G., Miller E.R., Ku P.K., Hogberg M.G., Lei X.G. (1997) Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. *J. Anim. Sci.* 75:1017-1025.
- Harada J.J. (1999) Signaling in plant embryogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:23–27.
- Harrison D, Mellenby E. (1934) Phytate acid and the rickets-producing action of cereal. *Biochem. J.* 28:517–28.
- Heaney R.P., Weaver C.M., Fitzsimmons M.L. (1991) Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Am. J. Clin. Nut.* 53:745–7.
- Higashi K., Kamada H., Harada H. (1996) The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 45:109-114.

- Hiraga S., Minakawa H., Takahashi K., Takahashi R., Hajika M, Harada K, Ohtsubo N (2007) Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Japanese soybean* cultivars. *Plant Biotechnol.* 24:435–440.
- Hita O., Lafarga C., Guerra H. (1997) Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietinum* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic acid and indole-3-butyric acid. *Acta Physiol. Plant.* 19:333-338.
- Hita O., Gallego P., Villalobos N., Lanas I., Blázquez A., Martín J.P., Fernández J., Martín L., Guerra H. (2003) Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 72:13–18.
- Hitz W.D., Carlson T.J., Kerr P.S., Sebastian S.A. (2002) Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.* 128:650–660.
- Holm P.B., Kristiansen K.N., Pedersen H.B. (2002) Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *J Nut.* 132(3):514S-516S.
- Holme I.B., Krogstrup P., Hansen J. (1997) Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus x ogiformis* Honda Giganteus as affected by proline. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 50:203-210.
- Honke J, Kozłowska H, Vidal-Valverde C, Frias J, Górecky R (1998) Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* A206:279–283.
- Hopwell R., Yeater R., Ullrich I. (1993) Soluble fiber: effect on carbohydrate and lipid metabolism. *Prog. Food Nut Sci.* 17:159–182.
- Hristov A.N., McAllister T.A., Cheng K.J. (1998) Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharides-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3146-3156.

- Hrubcová M., Cvikrová M., Eder J. (1994) Peroxidase activities and contents of phenolic acid in embryogenic and non-embryogenic alfalfa cell suspension cultures. *Biol. Plant.* 36:175–182.
- Huetteman C.A., Preece J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33:105-119.
- Huisman J., Tolman G.H, (2001) Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Developments in Pig Nutrition*, vol. 3. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 261–322.
- Hutton K., Foxcroft P. D. (1975) Effect of processing temperature on some indices of nutritional significance for micronized soya beans. *Proceedings of the Nutrition Society* 34:49A.
- Iantcheva A., Vlahova M., Gvetoslavova S., Evtimova M., Atanassov A. (2005) Somatic embryogenesis of the model legume - *Medicago truncatula* and other diploid medics. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 19:41-47.
- Ibragimova S.S., Smolenskaya S.E. (1997) Plant regeneration from seedling apex in annual medics. *Acta Agron. Hungarica* 45:109-116.
- Ibrahim R. K., Edgar D. (1976) Phenolic synthesis in *Perilla* cell suspension cultures. *Phytochem.* 15:129–131.
- Illés P., Schlicht M., Pavlovkin J., Lichtscheidl I., Baluska F., Ovecka M. (2006) Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *J. Exp. Bot.* 57:4201-4213.
- Imin N., Nizamidin M., Daniher D., Nolan K.E., Rose R.J., Rolfe B.G. (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncata*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol.* 137:1250–1260.

- Irigoyen J.J., Emerich D.W., Sanche-Daz M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84:55-60.
- Jacobs, M., Negrutiu, I., Dirks, R., Cammaerts, D. (1987) Selection programmes for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. In: Green, C.E.; Somers D.A., Hackett W.P., Biesboer D.D. (Ed.) *Plant Tiss. Cell Cult.* New York, Alan R Liss, pp.243-264.
- Jaffé W.G., Vega Lette C.L. (1968) Heat labile, growth inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nut.* 94:203-10.
- Jain A.K., Kumar S., Panwar, J.D.S. (2009) Antinutritional factors and their detoxification in pulses: A review. *Agric. Rev.* 30:64–70.
- Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. (1998) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, series 32. Kluwer, Dordrecht.
- Jamroz D., Kubizna J. (2008) Harmful substances in legume seeds their negative and beneficial properties. *Pol. J. Vet. Sci.* 11:389–404.
- Jansen S., Dessein S., Piesschaer F., Robbrecht E., Smets E. (2000) Aluminium accumulation in leaves of Rubiaceae: systematic and phylogenetic implications. *Ann. Bot.* 85:91-101.
- Jansman A.J.M. (1993) Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nut. Res. Rev.* 6:209–236.
- Jariteh M., Ebrahimzadeh H., Niknam V., Vahdati K., Amiri R. (2011) Antioxidant enzymes activities during secondary somatic embryogenesis in Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 10(20):4093-4099.
- Jariwalla R.J., Sabin R., Lawson S., Herman, Z.S. (1990) Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *J. Appl. Nut.* 42:18–28.

- Jayasankar S., Bondada B. R., Li Z., Gray D. J. (2003) Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid and liquid culture-derived proembryogenic cell masses. *Am. J. Bot.* 90:973–979.
- Jezierny D. (2009) In vivo and in vitro studies with growing pigs on standardised ileal amino acid digestibilities in grain legumes. Ph.D. Thesis. University of Hohenheim, Stuttgart, Cuvillier Verlag Göttingen, Germany.
- Jezierny D., Mosenthin R., Eklund M., Rademacher M. (2007) Determination of standardized ileal digestibilities of crude protein and amino acids in legume seeds for growing pigs. In: Proceedings of the 16th International Science Symposium on Nutrition of Domestic Animals, Radenci, pp. 198–203.
- Jezierny D., Mosenthin R., Bauer E. (2010) The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157 (2010) 111–128.
- Jeya Mary R., Jayabalan N. (1997) Influence of growth regulators on somatic embryogenesis in sesame. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 49: 67–70.
- Jha T.B., Mukherjee P., Datta M.M. (2007) Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 1:135–140.
- Jiménez V.M. (1996) El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. *Agronomía Costarricense* 20:187- 204.
- Jiménez V.M. (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev. Brasi de Fisio Veg* 13:196-223.
- Jiménez V.M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47:91–110.
- Jiménez V.M., Bangerth F. (2001). Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 67: 37–46.

- Jimenez-Ramsye L.M., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G., Elkin R.G. (1994) Absorption and distribution of ¹⁴C-labelled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *J. Agric. Food Chem.* 42:963–967.
- Jin S., Zhang X., Liang S., Nie Y., Gu, X., Huang, C. (2005) Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81:229–237.
- Jivotovskaya A.V., Senyuk V.I., Rotari V.I., Horstmann C., Vaintraub I.A. (1996) Proteolysis of phaseolin in relation to its structure. *J. Agric. Food Chem.* 44:3768–3772.
- Joersbo M., Andersen J.M., Okkels F.T., Rajagopal R. (1989) Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures. *Physiol. Plant.* 76:10–16.
- Jog S.P., Garchow B.G., Mehta B.D., Murphy P.P.N. (2005) Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 440:133-140.
- Johansen D.A. (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill:188.
- Johnsson I.D., Obst J.M., Davies R. (1982) Observations on the use of lupin feeding or exogenous hormones to improve the reproductive performance of stud and commercial ewes in the southeast of South Australia. *Wool Tech. Sheep Breed.* 30:23–30.
- Jones K.H., Senft J.A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetatepropidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33:77-79.
- Joung Y.H., Liao M.S., Roh M.S., Kamo K., Song J.S. (2002) *In vitro* propagation of *Campanula glomerata*, 'Acaulis' from leaf blade explants. *Sci. Hortic.* 92:137–146.

- Junaid A., Bhatt M.A., Mujib A., Sharma M.P. (2006) Somatic embryo proliferation maturation and germination in *Catharanthus roseus*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 84:325–332.
- Junaid A., Mujib A., Sharma M.P., Tang W. (2007a) Growth regulators affect primary and secondary somatic embryogenesis in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L) GDon) a morphological and biochemical levels. Plant Growth Regul. 51:271– 281.
- Junaid A., Mujib A., Bhat M.A., Sharma M.P., Samaj J. (2007b) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus*. Biol. Plant 51 (4):641–646.
- Jung Hans-Joachim G. (1997) Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. J. Nut. 127(5):810S-813S.
- Kairong C., Gengsheng X., Xinmin L., Gengmei X., Yafu W. (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. Plant Sci. 146:9–16.
- Kairong C., Ji L., Gengmei X., Jianlong L., Lihong W., Yafu W. (2002) Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 68(2):187-193.
- Karami O., Deljou A., Kordestani G.K. (2008) Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus*L.). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2:273 280.
- Kasprowicz M., Frankiewicz A. (2004) Apparent and standardized ileal digestibility of protein and amino acids of several field bean and pea varieties in growing pigs. J. Anim. Feed Sci. 13:463–473.
- Kavi Kishor P. B. (1989) Activities of phenylalanine and tyrosine-ammonia lyases and amino transferases during organogenesis in callus cultures of rice. Plant Cell Physiol. 30:25–29.

- Kavi Kishor P. B., Mehta A. R. (1988) Changes in some enzyme activities during growth and organogenesis in dark grown tobacco callus culture. *Plant Cell Physiol.* 29:255–259.
- Kawahara R., Komamine A. (1995) Molecular basis of somatic embryogenesis. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin, pp. 30–40.
- Kevers C., Gaspar Th., (1985) Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 118:41–48.
- Khan S.J., Khan M.A., Ahmad H.K., Khan R.D., Zafar Y. (2004a) Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and subsequent screening for salt tolerance. *Asian J. Plant Sci.* 3(3):330-334.
- Khan Z.I., Hussain A., Ashraf M., Ashraf M.Y., Valeem E.E., Ahmad M.S. (2004b) Soil and forage (Trace elements) status of a grazing pasture in the semiarid region of Pakistan. *Pak. J. Bot.* 4:851-856.
- Khan Z.I., Ashraf M., Hussain A., McDowell L.R. (2005) Seasonal variation of trace elements in a semiarid veld pasture. *Communications in soil science and plant analysis* 37:1471-1484.
- Khan Z.I., Hussain A., Ashraf M., McDowell L.R. (2006) Mineral status of soil and forages in south western Punjab, Pakistan. *Asian-Austr. J. Ani.l Sci.* 19(8):1139-1147.
- Khan Z.I., Ashraf M., Kafeel Ahmad K., Ahmad N., Danish M., Valeem E.E. (2009) Evaluation of mineral composition of forages for grazing ruminants in Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 41(5):2465-2476.
- Khandelwal S., Udipi S. A., Ghugre P. (2010) Polyphenols and tannins in indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Res. Int.* 43:526–530.

- Kielly G.A., Bowley S.R. (1992) Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* 35:474-477.
- Kim J.C., Pluske J.R., Mullan B.P. (2007) Lupins as a protein source in pig diets. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nut. Nat. Resource* 2(3):12.
- Kincaid R.L. (1999) Assessment of trace mineral status of ruminants: a review. *Proceedings of the American Society for Animal Sciences* 1–10.
- King T.P., Begbie R., Cadenhead A. (1983) Nutritional toxicity of raw kidney beans in pigs. Immunocytochemical and cytopathological studies on the gut and the pancreas. *J. Sci. Food Agric.* 34:1404–1412.
- Kintzios S.E., Taravira N. (1997) Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Breed* 116:359-362.
- Kirwan W.O., Smith A.N., McConell A.A., Mitchell W.D., Eastwood M.A. (1974) Action of different bran preparations on colonic function. *Brit. Med. J.* 4:187-189.
- Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Higashi K., Satoh S., Kamada H., Harada H. (1992) Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Mol. Biol.* 19:239–249.
- Kiyosue T., Satoh S., Kamada H., Harada H. (1993) Somatic embryogenesis in higher plants. *J. Plant Res. (Special Issue)* 3:75-82.
- Kneen E., Sandstead R.M. (1943) An amylase inhibitor from certain cereals. *J. Am. Chem. Soc.* 65:1247.
- Knuckles B.E. (1988) Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on lipase activity. *J. Food Sci.* 53:250–252.
- Knudsen Bach K.E. (1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:319–338.

- Knudsen Bach K.E. (2001) The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 90:3–20.
- Koh W.L., Loh C.S. (2000) Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 19:1177–1183.
- Komamine A., Matsumoto M., Tsukahara M., Fujiwara A., Kawahara R., Ito M., Smith J., Nomura K., Fujimura T. (1990) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. In: Nijkamp HJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 307-313.
- Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K., Fujimura T. (1992) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In vitro Cell. Dev. Bio. Plant* 28:11–14.
- Kong L., von Aderkas P. (2011) A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106:115-125.
- Konieczny R., Pilarska M., Tuleja M., Salaj T., Ilnicki T. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100:123–130.
- Konietzny U, Greiner R (2003) Phytic acid: nutritional impact. In: Caballero B, Trugo L, Finglas P (eds) *Encyclopaedia of food science and nutrition*. Elsevier, London, pp 4555–4563
- Köpke U., Nemecek T. (2010) Ecological services of faba bean. *Field Crops Res.* 115:217–233.

- Korbes A.P., Droste A. (2005) Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesq Agropec Bras*, Brasilia 40:211–216.
- Kormutak A., Salaj T., Matusova R., Vookova B. (2003) Biochemistry of zygotic and somatic embryogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.). *Acta Biologica* 45:59–62.
- Kornegay E. T. (2001) Digestion of phosphorus and other nutrients: The role of phytases and factors influencing their activity. Pages 237–272 in *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, New York, NY.
- Krsnik-Rasol M. (1991) Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int. J. Dev. Biol.* 35:259–263.
- Krsnik-Rasol M., Jelaska S., Šerman D. (1982) Isoperoxidases: early indicators of somatic embryoid differentiation in pumpkin tissue. *Acta Bot. Croat.* 41:33–39.
- Krsnik-Rasol M., Cipčić H., Hagege D. (1999) Isoesterases related to cell differentiation in plant tissue culture. *Chemico Biol. Interact.* 119–120:587–592.
- Kuksova V.B., Piven, N.M., Gleba, Y.Y. (1997) Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 49:17-27.
- Kumar V., Sinha A.K., Makkar H.P.S., Becker K. (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* 120:945–959.
- Kumar V., Sinha A.K., Makkar H.P.S., De Boeck G., Becker K. (2012) Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Ani. Physiol Anim. Nut.* 96(3):335-364.
- Kunyangaa C.N., Imungia J.K., Okotha M.W., Biesalskib H.K., Vadivelb V. (2012) Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *LWT - Food Sci. Technol.* 45:269-276.

- Kwon Y., Apostolidis E., Kim Y., Shetty K. (2007) Health benefits of traditional corn, beans and pumpkin: *in vitro* studies for hyperglycemia and hypertension management. *J. Medicin. Food* 10:266-275.
- Kysely W., Jacobsen H.J. (1990) Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 20:7-14.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lajolo F.M., Saura-Calixto F., Penna E.W., Menezes E.W. (2001) Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud, obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. São Paulo: Livraria Varela, pp.472.
- Lajolo F.M., Genovese M.I., Pryme I.F., Dale M, (2004) Beneficial (antiproliferative) effects of different substances. In: Muzquiz M, Hill GD, Pedrosa MM, Burbano C (eds) Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds, EAAP publication No. 110, Wageningen, pp 123–135
- Lakshmanan P., Geijskes R.J., Wang L., Elliott A., Grof C.P.L., Berding N., Smith G.R. (2006) Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep.* 25:1007–1015.
- Lallès J.P., Jansman A.J.M. (1998) Recent progress in the understanding of the mode of action and effects of antinutritional factors from legume seeds in non-ruminant farm animals. In: Jansman, A.J.M., Hill, G.D., Huisman, J., van der Poel, A.F.B. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, pp. 219–232.
- Lam S.K., Ng T.B. (2011) Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 89:45–55.

- Lambert M.G., Jung G.A., Harpster H.W., Lee J. (1989) Forage shrubs in North Island hill country. 4. Chemical composition and conclusions. NZ J. Agric. Res. 32:499-506.
- Larbi A., Khatib-Salkin A., Jammal B., Hassan S. (2011) Seed and forage yield, and forage quality determinants of nine legume shrubs in a non-tropical dryland environment. Anim. Feed Sci. Technol. 163:214–221.
- Larkin P., Scowcroft W. (1981) Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Gen. 60: 197-214.
- Larson S.R., Young K.A., Cook A., Blake T.K., Raboy V. (1998) Linkage mapping two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. Theor. Appl. Gen. 97:141–146.
- Le T.V., Dworschak E. (1986) Trypsin and chymotrypsin inhibitor activities in plant foods from Vietnam and Hungary. Nahrung 30:53–58.
- Le Berre-Anton V., Bompard-Gilles C., Paya F., Rouge P. (1997) Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Biochim. Biophys. Acta 1343:31–40.
- Le Gall M., Quillien L., Guéguen J., Rogniaux H., Sève B. (2005) Identification of dietary and endogenous ileal protein losses in pigs by immunoblotting and mass spectrometry. J. Nut. 135:1215–1222.
- Lease J. G. (1966) The effect of autoclaving sesame meal on its phytic acid content and on the availability of its zinc to the chick. Poult. Sci.45:237–241.
- Lee E.K., Cho D.Y., Soh W.Y. (2001) Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. Plant Cell Rep. 20:408–415.
- Lei X.G., Porres J.M. (2003) Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnol. Let. 25:1787–1794

- Lesins K.A., Lesins I. (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenic study. London: W. Junk.
- Leterme P. (2002) Recommendations by health organizations for pulse consumption. *Br. J. Nut.* 88:S239–S242.
- Li X.Q., Krasnyanski S.F., Korban S.S. (2002) Optimization of the UidA gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol. Biochem.* 40(5):453-459.
- Li Z.T., Dheken, S., Dutt M., van Anan M. Tattersll M.J., Kelley K.T., Gray, J. (2006) Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42:220–227.
- Libik M., Konieczny R., Pater B., Slesak I., Miszalski Z. (2005) Differences in the activities of some antioxidant enzymes and H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Rep.* 23:834–841.
- Liener I.E. (1989) Antinutritional factors in legume seeds: State of the art. In: Huisman, J., van der Poel, A.F.B., Liener, I.E. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, pp. 6–13.
- Liener I.E., Kakade M.L. (1980) Protease inhibitors. In: Liener, I.E. (Ed.), *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press, New York, pp. 7–71.
- Litz R.E., Moore G.A., Srinivasan C. (1985) *In vitro* systems for propagation and improvement of tropical fruits and palms. *Horticult. Rev.* 7:157-200.
- Litz R.E., Gray D.J. (1995) Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:416-425.
- Liu C.M., Xu Z.H., Chua N.H. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5:621–630.

- Liu Q.L., Xu X.H., Ren X.L., Fu H.W., Wu D.X., Shu Q.Y. (2006) Generation and characterisation of low phytic acid germplasm in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Gen.* 114:803–814.
- Lloyd G., McCown B.H. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30: 421-427.
- Lobarzewski J., Brzyska M., Wojcik A. (1990) The influence of metal ions on the soluble and immobilized cytoplasmic cabbage peroxidase activity and its kinetics. *J. Mol. Catal.* 59:373–383.
- Loewus F. (2002) Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: Reddy NR, Sathe SK (eds) *Food phytates*. CRC Press, Boca Raton, pp 53–61.
- Lönnerdal B., Sandberg A.S., Sandstrom B., Kunz C. (1989) Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nut.* 119:211–214.
- Lopes M.A., Larkins B.A. (1993) Endosperm origin, development and function. *Plant Cell* 5:1383–1399.
- López-Bellido F.J., López-Bellido L., López-Bellido R.J. (2005) Competition, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.). *Eur. J. Agron.* 23:359–378.
- Losso J.N. (2008) The biochemical and functional food properties of the Bowman- Birk inhibitor. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 48:94–118.
- Lou H., Kako S. (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortSci.* 29:906–909.
- Lou H., Kako S. (1995) Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci. Hortic.* 64:11–20.
- Lou J.P., Jia J.F., Gu Y.H., Liu J. (1999) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Sci.* 143:93–99.

- Louiseau J., Marche C., Deunff Y. (1995) Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 41:267-275.
- Lucia G., Rufinni Castiglione M., Turrini A., Nuti Ronchi V., Geri C. (2011) Cytogenetic and histological approach for early detection of "mantled" somaclonal variants of oil palm regenerated by somatic embryogenesis: first results on the characterization of regeneration system. *Caryologia* 64: 223-234.
- Lund P., Weisbjerg T.H. (2007) Digestible NDF is selectively retained in the rumen of dairy cows compared to indigestible NDF. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134(1, 2):1-17.
- Lyznik L.A., Hodges T.K. (1994) Transformation of maize protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) *Maize. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin, Springer-Verlag. v. 25, p. 217-240.
- MacDiarmid C.W., Milanic M.A., Eide D.J. (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277:39187–39194.
- Machado A.C., Puschmann M., Puhlinger H., Kremen R., Katinger H., Machado M.L.C. (1995) Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella* "autumno rosa" and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 14:335-340.
- Maehly A.C., Chance B. (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Meth. Biochem. Anal.* 1:385.
- Maheswaran, G., Williams E.G. (1985) Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. *Ann. Bot.* 56:619–630.

- Malik K.A. y Saxena P.K. (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgare* L., high frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta* 186: 384-389.
- Malik M.R., Wang F., Dirpaul J.M., Zhou N., Polowick P.L., Ferrie A.M.R., Krochko J.E. (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 144:134–154.
- Maluszynsky M., Ahloowalia B.S., Sigurbjornsson B. (1995) Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85:303-315.
- Mandal A.K.A., Gupta S.D., Chatterji A.K. (2001) Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of sunflower. *Biol. Plant.* 44:503–507.
- Marapara J.L., Omar M., Luis J.C., Rodríguez M., Martín R., García V.P., Valdés F. (1999) Embriogénesis somática “*in vitro*” de *Aconitum napellus* subsp. *Lusitanicum* L. (Ranunculaceae). Libro Resúmenes XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal pp. 330. Sevilla.
- Marcano A.K., Valdivieso E., Oropeza M. (2006) Detección de actividad fosfatasa ácida a partir de callos embriogénicos y no embriogénicos de caña de azúcar. *Agronomía Trop.* 56:657-661.
- Marchant R., Davey M.R., Lucas J.A., Power J.B. (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs. Trumpeter and Glad tidings. *Plant Sci.* 120:95-105.
- Marconi E., Ruggeri S., Cappelloni M., Leonardi D., Carnovale E. (2000) Physicochemical, nutritional, and microstructural characteristics of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) following microwave cooking. *J. Agric. Food Chem.* 48:5986-5994.

- Marquardt R.R. (1989) Dietary effects of tannins, vicine and convicine. In: Huisman, J., van der Poel, A.F.B., Liener, I.E. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. Center for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, pp. 141–155.
- Marsalis M.A., Angadia S.V., Contreras-Govea F.E. (2010) Dry matter yield and nutritive value of corn, forage sorghum, and BMR forage sorghum at different plant populations and nitrogen rates. *Field Crops Res.* 116: 52–57.
- Marshall J. (1975) α -Amilase inhibitors from plants. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 15:244-66.
- Marshall, J.J., Lauda C.M. (1975) Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 250: 8030-8037.
- Martín J.P., Pintos B., Rebordinos I., Villalobos N., Guerra H., Martín L. (2000) Embryogenic response in different *Medicago arborea* L. explants depending on cytokinin/auxin balances. *J. Plant Physiol.* 156:801-804.
- Martín-Cabrejas M.A., Díaz M.F., Aguilera Y., Benítez V., Mollá E., Esteban R.M. (2008) Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chem.* 107:1045–1052.
- McCown B.H., Russell J.A. (1987) Protoplast culture of hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.) *Specific Principles and Methods: Growth and Developments*. *Cell and Tissue Culture in Forestry* 2:16-30.
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D. (1988) *Nutrición Animal*. Acribia. Zaragoza.
- McDougall G. J., Stewart, D. (2005) The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23:189–195.
- McDowell L.R. (Ed.) (1985). *Nutrition of grazing ruminants in warm climates*. Academic Press.Orlando, Florida, (USA).

- McDowell L.R., Conrad J.M., Ellis G.L., Loosli J.K. (1983) Minerals for grazing ruminants in tropical regions. Extension Bulletin, Animal Science Department, University of Florida, Gainesville, FL.
- McDowell, L.R., Conrad J.H., Hembry F.G. (1993) Minerals for grazing ruminants in tropical regions. University of Florida, Gainesville.
- McDowell L.R., Arthington J.D. (2005) Minerals for grazing ruminants in tropical regions. University of Florida, Gainesville.
- Medina M., Villalobos N., De la Cruz P.J., Dorado A., Guerra H. (1998) Effect of culture medium and lighting conditions on the morphological characteristics and carbohydrate contents of *Medicago strasseri* calli. Acta Physiol. Plant. 20:383-392.
- Megia R., Haicour R., Tizroutine S., Bui-Trang V., Rossignol L., Sihachakr D., Schwendiman J. (1993) Plant regeneration from cultured protoplast of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). Plan Cell Rep. 13:41-44.
- Mekbungwan, A. (2007) Application of tropical legumes for pig feed. Anim. Sci. J. 78:342–350.
- Melo F.R., Sales M.P., Pereira L.S., Bloch C. Jr., Franco O.L., Ary M.B. (1999) α -Amylase inhibitors from cowpea seeds. Prot. Peptide Letters 6:385–390.
- Mendoza C., Viteri F.E., Lonnerdal B., Young K.A., Raboy V., Brown K.H. (1998) Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. Am. J. Clin. Nut. 68:1123–1128.
- Menéndez-Yuffá A., García E. (1996). Análisis de patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. Phytom, Int. J. Exp. Bot. 58 (1/2):15-22.
- Menéndez-Yuffá A., Barry-Etienne D., Bertrand B., Georget F., Etienne H. (2010) A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-

- scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 102(3):297–307.
- Merkle S.A., Parrott W.A., Williams E.G. (1990) Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: BHOJWANI, S.S. (Ed.) *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Amsterdam, Elsevier. p. 67-101.
- Mihaljevic S., Radic .S, Bauerb N., Garic .R, Mihaljevic B., Horvatc G., Leljak-Levanic D., Jelaska S. (2011) Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) *J. Plant Physiol.* 168: 1943– 1951.
- Mikie A., Peric V., Dordevic V., Srebric M., Mihailovic V. (2009) Antinutritional factors in some grain legumes. *Biotechnol. Anim. Husbandry* 25:1181–1188.
- Miller R.B., Karn R.C. (1980) A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 3:345-354.
- Minson D.J. (1982) Effect of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. En: *Nutritional Limits to Animal Production from Pastures*. 167-182. Hacker, J. B. (Ed.). CAB Farnham Royal (UK).
- Miron J., Zuckerman E., Adin G., Soloman R., Shoshani E., Nikbachat M., Yosef E., Zenou A., Gershon Weinberg Z., Chen Y., Halachmi I., Ben-Ghedalia D. (2007) Comparison of two forage sorghum varieties with corn and the effect of feeding their silages on eating behavior and lactation performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 139:23–39.
- Mohamed A.A., Rayas-Duarte P. (1995) Composition of *Lupinus albus*. *Cereal. Chem.* 72:643–647.
- Mohanty B.D., Ghosh P.D. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Hordeum vulgare*. *Ann. Bot.* 61:551–555.
- Monti L.M., Grillo S. (1983) Legume seed improvement for protein content and quality. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nut.* 32:253–266.

- Moon H.K., Park S.Y., Kim Y.W., Kim S.H. (2008). Embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44 (2):119–127.
- Moreno J., Chrispeel M.H. (1989) A lectin gene encodes α -amylase inhibitor of common bean, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7885–7889.
- Morini S., D’Onofrio C., Bellocchi G., Fisichella M. (2000) Effect of 2,4.D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* culture quince leaves. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 63:47-55.
- Morris E.R. (1986) Phytate and dietary mineral bioavailability. Pages 57–76 in *Phytic Acid Chemistry and Application*. Pilatus, Minneapolis, MN.
- Morris E.R., Ellis R. (1980) Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rats fed semipurified diets. *J. Nut.* 110:1037–1045.
- Moss D.W. (1982) Isoenzymes. Chapman & Hall Ltd., pp 204. London.
- Mubarak A. E. (2005) Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chem.* 89:489–495.
- Mujib A., Sama J. (2006) Somatic Embryogenesis. Springer, Berlin.
- Mul A.J., Perry F.G. (1994) The role of fructo-oligosaccharides in animal nutrition. In: Garnsworthy, P.C., Cole, D.J.A. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 57–79.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473±497.
- Muzquiz M., Wood J. A. (2007) Antinutritional Factors. In S. S. Yadav, R. Redden, W. Chen, & B. Sharma (Eds.), *Chickpea Breeding & Management* (pp. 143–167). Trowbridge, UK: Cromwell Press.

- Mwanamwenge J., Loss S.P., Siddique K.H.M., Cocks P.S. (1998) Growth, seed yield and water use of faba bean (*Vicia faba* L.) in a short season Mediterranean type environment. *Aust. J. Exp. Agric.* 38:171–180.
- Namasivayam P., Skepper J., Hanke D. (2006) Identification of a potential structural marker for embryogenic competency in the *Brassica napus* spp. *oleifera* embryogenic tissue. *Plant Cell Rep.* 25:887-895.
- Nasim S.A., Mujib A., Rashmi K., Fatima S., Junaid A., Mahmooduzzafar (2009) Improved Allin yield in somatic embryogenesis of *Allium sativum* L (CV. YAMUNA SAFED) as analyzed by HPTLC. *Acta Biol. Hungarica* 60 (4):441–454.
- Nasim S.A., Mujib A., Kapoor R., Fatima S., Junaid A, Mahmooduzzafar (2010) Somatic embryogenesis in *Allium sativum* L. (cv. Yamuna Safed 3): Improving embryo maturation and germination with PGRs and carbohydrates. *Anal. Biol.* 32:1-9.
- Nergiz C., Gokgoz, E. (2007) Effects of traditional cooking methods on some antinutrients and *in vitro* protein digestibility of dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in turkey. *Int. J. Food Sci. Technol.* 42:868–873.
- Nernberg L.W.J. (1998) Improved phosphorus availability in poultry feed wheat/canola meal-based diets supplemented with phytase enzyme. University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada. M.S. Thesis. Nernberg, L.W.J. 1998. Improved phosphorus availability in poultry feed wheat/canola meal-based diets supplemented with phytase enzyme. University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada. M.S. Thesis.
- Neus J.D., Fehr W.R., Schnebly S.R. (2005) Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. *Crop Sci.* 45:589–592.
- Nielsen S. S. (1991) Digestibility of legume proteins. *Food Technol.* (Sep.) 112:114- 118.

- Nielsen S.S., Deshpande S.S., Hermodson M.A., Scott M.P. (1988) Comparative digestibility of legume storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* 36:896–902.
- Nieves N., Segura-Nieto M., Blanco M. A., Sánchez M., González A. (2003) Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39:343-345.
- Nishiwaki M., Fujino K., Koda Y., Masuda K., Kikuta Y. (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211:756–759.
- Niu S.S., Song S.W., Yan F., Miao H.X. (2006) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Citrullus lanatus* cv. Zhengkang No. 4. *J. Fruit Sci.* 23(3):406-410.
- Nolan K.E., Rose R.J., Gorst J.R. (1989) Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Rep.* 8:278–281.
- Nomura K., Komamine A. (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79:988–991.
- NRC (1985) Nutrient requirements of sheep. 6th ed. National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
- Nuutila A.M., Villiger C., Oksman-Caldentey K.M. (2002) Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat (*Avena sativa* L.) leaf-base segments: influence of nitrogen balance, sugar and auxin. *Plant Cell Rep.* 20:1156–1161.
- Nyange N.E., Williamson B., McNicol R.J., Lyon G.D., Hackett, C.A. (1995) *In vitro* selection of *Coffea arabica* callus for resistance to partially purified phytotoxic culture filtrates from *Colletotrichum kahawae*. *Ann. Appl. Biol.* 127:425- 439.

- Oberleas D., Harland B.F. (1996) Impact of phytic acid on nutrient availability. Pages 77–84 in *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*. BASF Corp., Mount Olive, NJ.
- Ochatt S.J., Pontecaille C., Rancillac M. (2000) The growth regulators used for bud regeneration and shoot rooting affect the competence for flowering and seed set in regenerated plants of protein peas. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:188–193.
- O'Dell B.L., Savage J.E. (1960) Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103:304–306.
- Ogata Y., Iizuka M., Nakayama D., Ikeda M., Kamada H., Koshihara T. (2005) Possible involvement of abscisic acid in the induction of secondary somatic embryogenesis on seed-coat-derived carrot somatic embryos. *Planta* 221:417–423.
- Oliver A.L., Grant R.J., Pedersen J.F., O'Rear J. (2004) Comparison of brownmidrib-6 and -18 forage sorghum with conventional sorghum and corn silage in diets of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:637–644.
- Onomi S., Okazaki Y., Katayama T. (2004) Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:1379–1381.
- Orczyk A.N. (1992) Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 28:19-25.
- Oropeza M., De Gracia E. (1996) Somaclonal variants resistant to sugarcane mosaic virus and their agronomic characterisation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32:26-30.
- Othmani A., Bayouh C., Drira N., Marrakchi, M., Trifi M. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L.,

- cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 97:71-79.
- Paek K.Y., Chakrabarty D., Hahn E.J. (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81(3):287-300.
- Papachristou T.G., Papanastasis V.P. (1994) Forage value of Mediterranean deciduous woody fodder species and its implication to management of sylvopastoral systems. *Agrofor. Syst.* 27:269–282.
- Partanen K., Alaviuhkola T., Siljander-Rasi H., Suomi K. (2003) Faba beans in diets for growing-finishing pigs. *Agric. Food Sci.* 12:35–47.
- Pasternak T.P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H.A., Dudits D., Feher A. (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129:1807–1819.
- Pasternak T.P., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.K. (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *J. Exp. Bot.* 58:991–2001.
- Pastor-Cavada E., Juan R., Pastor J.E., Alaiz M., Vioque J. (2011) Nutritional characteristics of seed proteins in 15 *Lathyrus* species (fabaceae) from Southern Spain *LWT - Food Sci. Technol.* 44:1059-1064
- Pastrana R., McDowell L.R., Conrad J.H., Wilkinson N.S. (1991a) Mineral status of sheep in the Paramo region of Colombia. II. Trace Minerals. *Small Rumin. Res.* 5:23-34.
- Pastrana R., McDowell L.R., Conrad J.H., Wilkinson N.S. (1991b) Macromineral status of sheep in the Paramo region of Colombia. *Small Rumin. Res.* 5:9-21.
- Payan F. (2004) Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1696:171-180.

- Pearson C.J., Ison R.L. (1987) Vegetative Growth. En: Agronomy of Grassland Systems. 28-47. Pearson, C.J. e Ison, R.L. (Eds).Cambrige University Press. Cambridge (UK).
- Pecetti L., Tava A., Pagnotta M., Russi L. (2007) Variation in forage quality and chemical composition among Italian accessions of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. J. Sci. Food Agric. 87:985–991.
- Pedersen S., Andersen S.B. (1993) Developmental expression of isoenzymes during embryogenesis in barley anther culture. Plant Sci. 91:75–86.
- Pedrosa M.M., Cuadrado C., Burbano C., Allaf K., Haddad J., Gelencsér E., Takács K., Guillamón E., Muzquiz M. (2012) Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin inhibitors and lectins contents of different legumes. Food Chem. 131: 862-868.
- Peiter E., Sun J., Heckmann A.B., Venkateshwaran M., Riely B.K., Otegui M.S., Edwards A., Freshour G., Hahn M.G., Cook D.R., Sanders D., Oldroyd G.E.D., Downie J.A., Ane J.M. (2007) The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. Plant Physiol. 145:192-203.
- Peña-Ramírez Y., García-Sheseña I., Hernández-Espinoza A., Domínguez-Hernández A., Barredo-Pool F., González-Rodríguez J., Robert M. (2011) Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 105:203–209.
- Peoples M.B., Herridge D.F., Ladha J.K. (1995) Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? Plant Soil 174:3–28.
- Peres H., Oliva-Teles A. (2002) Utilization of raw and gelatinized starch by European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 205:287–299.

- Periago M.J., Englyst H.N., Hudson G.J. (1996) The influence of thermal processing on the non-starch polysaccharide (NSP) content and *in vitro* digestibility of starch in peas (*Pisum sativum*, L.). *Lebens. Wiss. Technol.* 29:33-40.
- Perl-Treves R., Perl A. (2002) Oxidative stress: an introduction. In: Inze D, van Montagu M, editors. *Oxidative stress in plants*. London, New York: Taylor & Francis Inc. p. 1–33.
- Petterson D.S. (2000) The use of lupins in feeding systems: review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13:861–882.
- Phillippy B.Q. (2003) Inositol phosphates in foods. *Adv. Food Nut. Res.* 45:1–60.
- Pilu R., Panzeri D., Gavazzi G., Rasmussen S.K., Consonni G., Nielsen E. (2003) Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (*lpa241*). *Theor. Appl. Gen.* 107:980–987
- Pinto G., Valentin H., Costa A., Castro S., Santos C. (2002a) Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus ruber* L. tree. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:569-572.
- Pinto G., Santos C., Neves L., Araujo C. (2002b) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Rep.* 21:208-213.
- Pires V.M.R., Fontes C.M.A., Ferreira L.M.A., Guerreiro C.I.P.D., Cunha L.F., Freire J.P.B. (2007) The effect of enzyme supplementation on the true ileal digestibility of a lupin based diet for piglets. *Livest. Sci.* 109:7–59.
- Pirgozliev V., Bedford M.R., Oduguwa O., Acamovic T., Allymeh M. (2012) The effect of supplementary bacterial phytase on dietary metabolisable energy, nutrient retention and endogenous losses in precision fed broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nut.* 96 (1):52-57.
- Platiša J., Veljović-Jovanović S., Kukavica B., Vinterhalter B., Smigocki A., Ninković S. (2008) Induction of peroxidases and superoxide dismutases in

- transformed embryogenic calli of alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Plant Physiol. 165:895-900.
- Pospisilova J., Ticha I., Kadlec P., Haisel D., Plzakova S. (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biol. Plant 42:481–497.
- Potrykus, I. (1990) Gene transfer to plants: assessment and perspectives. Physiol. Plant. 79:125-134.
- Potters G., Pasternak T., Guisez Y., Palme K.J., Jansen M. (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? Trends Plant Sci. 12:98–105.
- Prabhakara Rao P.G., Narsing Rao G., Jyothirmayi T., Karuna M.S.L., Prasad R.B.N. (2010) Analysis of lipid classes and fatty acid composition of Adavi chinta (*Entada pursaetha*) seed oil. J. Lipid Sci. Technol. 42(2):66-68.
- Prado M.J., Grueiro M.P., González M.V., Testillano P.S., Domínguez C., López M., Rey M. (2010a) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). Sci. Hortic. 125:342–352.
- Prado M.J., Rodríguez E., Rey L., González M.V., Santos C., Rey M. (2010b) Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 103(1): 49–59.
- Prakash E., Sha-Valli-Khan P.S., Sairam-Reddy P., Rao K.R. (1999) Regeneration of plants from seed-derived callus of *Hybanthus enneaspermus* L. Muell., a rare ethnobotanical herb. Plant Cell Rep. 18:873-878.
- Prange A.N.S., Serek M., Bartsch M., Winkelmann T. (2010) Efficient and stable regeneration from protoplasts of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 101:171–182.

- Pretová A., Obert B., Hajduch M., Gregova E. (2001) Total protein and isozyme characterization in the flax zygotic embryo during development. *Sex. Plant Reprod.* 13:329– 334.
- Pugalenthi M., Vadivel V., Gurumoorthi P., Janardhanan. K. (2004) Comparative nutritional evaluation of little known legumes: *Tamarindus indica*, *Erythrina indica* and *Sesbania bispinosa*. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 4:107-123.
- Pullman G.S., Gupta P.K., Timmis R., Carpenter C., Kreitinger M., Welty, E. (2005) Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. *Plant Cell Rep.* 24:271–279.
- Pusztai A., Bardocz S., Martín-Cabrejas M.A. (2004) The mode of action of ANFs on the gastrointestinal tract and its microflora. In: Muzquiz, M., Hill, G.D., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M., Burbano, C. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 87–100.
- Quiroz-Figueroa F R., Fuentes-Cerda C.F.J., Rojas-Herrera R., Loyola- Vargas, V.M. (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 20:1141–1149.
- Quiroz-Figueroa F.R., Rojas-Herrera R., Galaz-Avalos R.M., Loyola-Vargas V.M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86:285-301.
- Raboy V. (2001) Seeds for a better future: “low phytate” grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci.* 6:458–462.
- Raboy V. (2003) Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochem.* 64:1033-43.

- Raboy V. (2006) Seed phosphorus and the development of low-phytate crops. In: Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ (eds) Inositol phosphates: linking agriculture and environment. CAB International, Wallingford, pp 111–132.
- Raboy V. (2007) The ABCs of Low-Phytate Crops. *Nature Biotechnol.* 25:874–875.
- Radha C., Ramesh P., Prakash V. (2007) Preparation and characterisation of protein hydrolysate from an oil seed flour mixture. *Food Chem.* 106:1166–1174.
- Raemakers C.J.J.M., Jacobsen E., Visser R.G.F. (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93–107.
- Raghavan V., 1976. Adventive embryogenesis: Induction of diploid embryoids. In: Sutchliffe, J. F. (Ed). *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press, London, pp. 349–381.
- Raghavan V. (1986) Embryogenesis in angiosperms: A developmental and experimental study. Cambridge University Press, New York, pp. 377–443.
- Raghu A.V., Unnikrishnan K., Geetha S.P., Martin G., Balachandran I. (2011) Plant regeneration and production of embelin from organogenic and embryogenic callus cultures of *Embelia ribes* Burm. f.: a vulnerable medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47(4):506–515.
- Rai M.K., Jaiswal V.S., Jaiswal U. (2008) Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Sci. Hortic.* 117:302–305.
- Rai M.K., Asthana P., Singh S.K., Jaiswal V.S., Jaiswal U. (2009) The encapsulation technology in fruit plants: A review. *Biotechnol. Adv.* 27(6):671–679.
- Rai M.K., Shekhawat N.S., Harish, Gupta A.K., Phulwaria M., Ram K., Jaiswal U. (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106:179–190.

- Raj Bhasali R., Driver J.A.A., Durzan D.J. (1990) Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 9:280-284.
- Ramakrishna V., Jhansi R. P., Ramakrishna R. P. (2006) Antinutritional factors during germination in Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *World J. Dairy Food Sci.* 1:6–11.
- Ramarosandratana A., Harvengt L., Bouvet A., Calvayrac R., Paques M. (2001) Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:29–34.
- Ramos S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic related to cancer chemoprevention. *J. Nut. Biochem.* 18:427–442.
- Randhir R., Kwon Y., Shetty K. (2008) Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedling. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 9:355-364.
- Rao K.V., Suprasanna P., Reddy G.M. (1990) Biochemical changes in embryogenic and non-embryogenic calli of *Zea mays* L. *Plant Sci.* 66:127-130.
- Rasmussen S.K., Hatzack F. (1998) Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analyses. *Hereditas* 129:355–368.
- Ratanasanobon K., Seaton K. (2010) Development of *in vitro* plant regeneration of Australian native waxflowers (*Chamelaucium* spp.) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100:59–64.
- Razdan M.K. (1993). Somatic embryogenesis. In: Razdan MK (ed), An introduction to plant tissue culture. New Delhi: Oxford & IBH Publi Co Pvt Ltd., pp 87-102.

- Reddy N.R., Sathe S.K., Salunkhe D.K. (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28:1-91.
- Rehman Z., Shah W. H. (2005) Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chem.* 91:327–331.
- Reid D.A., Lott J.N.A., Attree S.M., Fowke L.C. (1999) Mineral nutrition in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seeds and somatic embryos. I. phosphorus, phytic acid, potassium, manganese, calcium, iron and zinc. *Plant Sci.* 141:11-18.
- Reinert J. (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus karroten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345.
- Rejili M., Vadel A.M., Guetet A., Neffatti M. (2007) Effect of NaCl on the growth and the ionic K^{\pm} / Na^{\pm} of two populations of *Lotus creticus*(L.) (Papilionaceae). *South Afr. J. Bot.* 73: 623-631.
- Reuter D.J., Robinson J.B. (1997) *Plant Analysis. An Interpretation Manual.* 2nd ed. CSIRO Publishing: Melbourne.
- Revilla M.A., Tolivia D., Fernández Tárrago J.A. (1986) A new and permanent staining method for starch granules using fluorescence microscopy. *Stain Technol.* 61:151-154.
- Rezazadeh R., Harrison D.K., Williams R.R. (2011) Intraspecific somatic hybridization of mango (*Mangifera indica* L.) through protoplast fusion. *J. Appl. Horticult.* 13(2):101-107.
- Richardson M. (1991) Seed storage proteins: the enzyme inhibitors, in: L.J. Rogers (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry* Vol 5, Academic Press, New York, pp. 259–305.
- Robinson E.H., Li M.H., Manning B.B. (2002) Comparison of microbial phytase and dicalcium phosphate for growth and bone mineralization of pond-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Appl. Aqua.* 12:81-88.

- Rodríguez-Sahagún A., Acevedo-Hernández G., Rodríguez-Domínguez J., Rodríguez-Garay B., Cervantes-Martínez J., Castellanos-Hernández O. (2011) Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104:271–275.
- Rojas-Herrera R., Quiroz-Figueroa F.R., Monforte-González M., Sánchez-Teyer F., Loyola-Vargas V.M. 2002. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotechnol.* 21:43–50.
- Rout G.R., Samantaray S., Das P. (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu*, a multipurpose leguminous tree. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 42:283-285.
- Rout G.R., Mohapatra A., Jain S.M. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 24: 531–560.
- Roy F., Boye J. I., Simpson B. K. (2010) Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res. Int.* 43:432–442.
- Ruiz de Lope C., García-Villanova R.J., García-Villanova R. (1982) Estudio del contenido en ácido fítico durante el proceso de elaboración del pan blanco, pan integral y pan ázimo. *Ars Pharmaceutica* 23(4):437-42.
- Runge C.F., Senauer B., (2007). How Biofuels Could Starve the Poor. *Foreign Affairs* 41.
- Sadiq M., Abdurrehman W.A. (1999) Elemental composition of alfalfa leaves and its relation to soil composition and irrigation water quality in the Eastern Province of Saudi Arabia. *J. Plant Nut.* 22:1269-1278.
- Saini H.S. (1989) Thermal stability of protease inhibitors in some cereals and legumes. *Food Chem.* 32:59–67.

- Salgado P., Freire J.P.B., Mourato M., Cabral F., Toullec R., Lallès J.P. (2002a) Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. *Livest. Prod. Sci.* 74:191–202.
- Salgado P., Martins J.M., Carvalho F., Abreu M., Freire J.P.B., Toullec R., Lallès J.P., Bento O. (2002b) Component digestibility of lupin (*Lupinus angustifolius*) and pea (*Pisum sativum*) seeds and effects on the small intestine and body organs in anastomosed and intact growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 98:187–201.
- Salgado P., Freire J.P.B., Ferreira R.B., Teixeira A., Bento O., Abreu M.C., Toullec R., Lallès J.P. (2003) Immunodetection of legume proteins resistant to small intestinal digestion in weaned piglets. *J. Sci. Food Agric.* 83:1571–1580.
- Salunke B.K., Patil K.P., Wani M.R, Maheswari V.L. (2006) Antinutritional constituents of different grain legumes grown in North Maharashtra. *J. Food Sci. Tech.* 43:519-521.
- Salunkhe D.K., Kadam S.S., Chavan Jk. (1985) Chemical composition. In: DK. Salunkhe, SS. Kadam and JK. Chavan (eds). *Post harvest Biotechnology of Food legumes*. CRC press Inc: Boca Rabon, FL. pp29-52.
- Samaj J., Baluska F., Bobak M., Volkmann D. (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Rep.* 18:369-374.
- Samoylov V.M., Tucker D.M, Thibaud-Nissen F., Parrott W.A..(1998) A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures. *Plant Cell Rep.* 18:49-54.
- Sancha J.L., Alegre J., Guerrero A., Yébenes L. (1993) Caracterización nutritiva de arbustos forrajeros: II. Digestibilidad e ingestión. XVIII Jornadas científicas de la S.E.O.C, Albacete (Spain).

- Sánchez-Yélamo M.D. (1992) Isoenzyme electrophoretic studies among some species of the genus *Erucastrum* and *Hirschfeldia incana* (Cruciferae: Brassiceae) with reference to their chemotaxonomic relationships. *Bioch. System. Ecol.* 20(7):631-637.
- Sandberg A.S., Andlid T. (2002) Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:823–833.
- Santoro L.G., Grant G., Puzstai A. (1999) *In vivo* degradation and stimulating effect of phaseolin on nitrogen secretion in rats. *Plant Foods Hum. Nut.* 53:223–236.
- Santos K.G.B.D., Mariath J.E.D.A., Moco M.C.C., Zanettini M.H.B. (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Ontogeny of somatic embryos. *Brasil Archives Biol. Technol.* 49:49–55.
- Sasaki K., Shimomura K., Kamada H., Harada H. (1994) IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiol.* 35:1159-1164.
- Sathe S.K., Sze-tao K.W.C. (1997) Effects of sodium chloride, phytate and tannin on *in vitro* proteolysis of phaseolin. *Food Chem.* 59:253–259.
- Saura-Calixto F., Goni I. (2009) Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 49:145–152.
- Scandalios J.G. (1974) Isoenzymes in development and differentiation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25:225-258.
- Scarpa G.M., Pupilli F., Damiani F., Arcioni S. (1993) Plant regeneration from callus and protoplasts in *Medicago polymorpha*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 35:49–57.
- Schaefer J. (1985) Regeneration in alfalfa tissue culture—characterisation of intracellular pH during somatic embryo production by solid-state P-31 NMR. *Plant Physiol.* 79:584–589.

- Schenk R.U. Hildebrandt, A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199.
- Schöpke C., Taylor N., Cárcamo R., Da Koffi-Konan N., Marmey P., Henshaw G.G., Beachy R.N., Fauquet C. (1996) Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. *Nature Biotechnol.* 14:731-735.
- Schuster-Gajzago I., Kiszter A. K., Toth-Markus M., Barath A., Markus-Bednarik Z., Czukor B. (2006) The effect of radio frequency heat treatment on nutritional and colloid-chemical properties of different white mustard (*Sinapis alba* L) varieties. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 7:74-79.
- Schween G., Schwenkel H.G. (2002) *In vitro* regeneration in *Primula* ssp. via organogenesis. *Plant Cell Rep.* 20:1006-1010.
- Schwennesen J., Mielke E.A., Wolfe W.H. (1982) Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *HortSci.* (17):366-368.
- Seetharama N., Sairam R.V., Rani T.S. (2000) Regeneration in sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 61:169-173.
- Segui-Simarro J M., Nuez F. (2007) Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *J. Exp. Bot.* 58:1119–1132.
- Selvam R. (2002) Calcium oxalate stone disease: Role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urolog. Res.* 30(1):35–47.
- Seoane J. R. (1981) Quality and utilization of forage crops by ruminants. En: *Procc. Nat. Forage Symposium* 98-106. Canadá.
- Seymour G.B., Gross K.C. (1996) Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News Info* 7:45N–52N.

- Shanmughavel P., Sha L., Zheng Z., Cao M. (2001) Nutrient cycling in a tropical seasonal rain forest of Zishuangbanna, Southwest China. 1. Tree species: nutrient distribution and uptake. *Bioresour. Technol.* 80:163-170.
- Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Maraffa, S B. (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticul. Rev.* 2: 268–310.
- Shaul O. (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals*15:309–323.
- Shen R.F., Ma J.F. (2001) Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J Exp Bot* 52:1683-1687.
- Shetty K. (1997) Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on lamianaceae. *Asia. Pac. J. Clini. Nutri.* 6:162-71.
- Shevchenko A., Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., Sagliocco E., Wilm M., Vorm O., Mortensen Y., Boncherie H., Mann M. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(25):14440-14445.
- Shi J.R., Wang H.Y., Wu Y.S., Hazebroek J., Meeley R.B., Ertl D.S. (2003) The maize low phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* 131:507–515.
- Shi J.R., Wang H.Y., Hazebroek J., Ertl D.S., Harp T. (2005) The maize lowphytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant J.* 42(5):708– 719.
- Shi J.R., Wang H.Y., Schellin K., Li B., Faller M., Stoop J.M., Meeley R.B., Ertl D.S., Ranch J.P., Glassman K. (2007) Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnol.* 25:930 – 937.

- Shi X., Dai X., Liu G., Zhang J., Ning G., Bao M. (2010) Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46:117–125.
- Shimelis E.A., Rakshit S.K. (2005) Antinutritional factors and *in vitro* protein digestibility of improved haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *Int. J. Food Sci. Nut.* 56:377–387.
- Shimelis E.A., Rakshit S.K. (2007). Effect of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chem.* 103:161–172.
- Shohael A.M., Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007) Glutathione metabolism and antioxidant responses during *Eleutherococcus senticosus* somatic embryo development in a bioreactor. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89:121–129.
- Siddiqui Z., Mujib A., Maqsood M. (2011) Liquid overlaying improves somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104:247–256.
- Silanikove N., Gilboa N., Nitsan Z. (1997) Interactions among tannins, supplementation and polyethylene glycol in goats given oak leaves: effects on digestion and food intake. *Anim. Sci.* 64:479–483.
- Silva M.L., Paim Pinto D.L., Guerra M.P., Floh E.I.S., Bruckner C.H., Otoni W.C. (2009) A novel regeneration system for a wild passionfruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) species based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99:47–54.
- Singh N.D., Sahoo L., Sarin N.B., Jaiwal P.K. (2003) The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L Mill sp.). *Plant Sci.* 164:341–347.

- Singh S., Lewis N.G., Towers G.H.N. (1998) Nitrogen recycling during phenylpropanoid metabolism in sweet potato tubers. *J. Plant Physiol.* 153:316–23.
- Singsit C., Adang M.J., Lynch R.E., Anderson W.F., Wang A., Cardineau G., Ozias-Akins P. (1997) Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer. *Transgenic Res.* 6:169-176.
- Sita G.L., Rao M.M. (2005) Direct somatic embryogenesis from immature seeds of rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). In: Pareek LK, Swarnkar PL (eds) Trends in plant tissue culture and biotechnology. Agrobios, Jodhpur, pp 271–279.
- Sivanesan I., Lim M.Y., Jeong B.R. (2011) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. Rubriflora Makino. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 107:365–369.
- Slavin J. (2003) Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *J. Food Compos Anal.* 16(3):287-291.
- Smith D.L., Krikorian A.D. (1990a) pH control of carrot somatic embryogenesis. In: Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, VanAartrijk J (eds) Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 449-453.
- Smith D.L., Krikorian A.D. (1990b) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 9:34–37.
- Smith D.L., Krikorian, A.D. (1992) Low external pH prevents cell elongation but not multiplication of embryogenic carrot cells. *Physiol. Plant.* 84:495-501.
- Sofiari E., Raemakers C.J.J.M., Kanju E., Danso K., Lammeren A.M. van, Jacobsen E., Visser R.G.F. (1997) Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 50:45-56.

- Somleva M.N., Schmith E.D.L., de Vries S. (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.* 19:718-726.
- Speir T.W., Ross D.J. (1978) Soil phosphatase and sulphatase. In: *Soil Enzymes*; (Burns RG Ed.). Pp 197-250. Academic Press: New York.
- Spiral J., Thierry C., Paillard M., Petiard V. (1993) Regeneration of plantlets of *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Comptes Rendus a l'Academie des Sciences, Série III*, 316:1-6.
- Stein H.H., Benzoni G., Bohlke R.A., Peters D.N. (2004) Assessment of the feeding value of South Dakota-grown field peas (*Pisum sativum* L.) for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 82:2568–2578.
- Steward F.C., Mapes M.O., Mears K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45:705-708.
- Steward N., Martin R., Engasser J.M., Goergen J.L. (1999) A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Rep.* 19:171–176.
- Stirn S., Jacobsen H.J. (1987). Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.* 6:50-54.
- Storebakken T. (1985) Binders in fish feeds: I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture* 47:11–26.
- Stuart D.A., Strickland S.G. (1984) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. II. The interaction of amino acids with ammonium. *Plant Sci. Lett.* 34:175–181.
- Suliman Elmeer K.M., Gallagher T.F., Hennerty M.J. (2009) RAPD-based detection of genomic instability in cucumber plants derived from somatic embryogenesis *Afr. J. Biotechnol.* 8(14):3219-3222.

- Sun J.Y., Li W.M., Zhang H.S., Zhao J.L., Yin X.L., Wang L.A. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in glandless upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Front. Agric. China* 3: 279–283.
- Suneja Y., Kaur S., Gupta A.K., Kaur N. (2011) Levels of nutritional constituents and antinutritional factors in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) *Food Res. Int.* 44:621–628.
- Sung Z.R, Okimoto R. (1981). Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3683-3687.
- Suttle N. F., Jones D. G. (1989) Recent developments in trace element metabolism and function: Trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. *J. Nut.* 119:1055-1061.
- Sveinbjornsson J., Murphy M., Udén P. (2006) Effect of the proportions of neutral detergent fibre and starch, and their degradation rates, on *in vitro* ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130(3, 4):172-190.
- Tabatabai M.A. (1994) Soil enzymes. In: Weaver, RW, Augle S, Bottomly PJ, Bezdicsek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbial and biochemical properties*, No. 5. Soil Science Society of America, Madison. pp.775-833.
- Taiz L., Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*, 5th edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, MA, USA.
- Tang H.R, Wang Y.Q., Ren Z.L. (2000) An overview of progress on somatic embryogenesis and transformation in walnut. *Scientia Silvae Sinicae* 36(3):102-110.
- Tang H.R., Ren Z.L., Reustle G., Krczal G. (2002) Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Sci. Hortic.* 93:235-244.
- Taylor M.G., Vasil I.K. (1996) The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*: Poaceae). *Am. J. Bot.* 83:28–44.

- Tchorbadjieva M., Odjakova M.K.(2001) An acid esterase as a biochemical marker for somatic embryogenesis in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 20:28-33.
- Thavarajah P., Thavarajah D., Vandenberg A. (2009) Low phytic acid lentils (*Lens culinaris* L.): A potential solution for increased micronutrient bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 57:9044-9049.
- Theander O., Aman P. (1980) Chemical composition of some forages and various residues from feeding value determinations. *J. Sci. Food Agric.* 31: 31-37.
- Theander O., Westerlund E., Åman P., Graham H. (1989) Plant cell walls and monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23:205–225.
- Thibaud-Nissen F., Shealy R.T., Khanna A., Vodkin L.O. (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol.* 132:118–136.
- Thomas T., Chaturvedi R. (2008) Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 93:1-14.
- Thomas T.D. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26:618–631.
- Thompson L.U. (1993) Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res. Int.* 26:131–149.
- Thorpe T.A. (1980) Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects. In: Vasil IK 8ed) perspective in plant cell and tissue culture, suppl 11A. academic Press, New York, pp 71-105.
- Thorpe T.A. (2007) History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* 37:169–180.
- Tisserat B. (1985) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon RA (ed.) *Plant cell culture: a practical approach*. IRL Press, Eynsham, pp 79–104.

- Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt Ed D.L., Verhoeven H.A., Van Kammen A., de Vries S.C. (1994) Description of somatic embryo forming single-cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194:565–572.
- Toonen M.A.J., De Vries S.C. (1996) Initiation of somatic embryos from single cells. In: Wang, T.L. & Cuming, A. (Eds.) *Embryogenesis: the generation of a plant*. Oxford UK, Bios Scientific, 1996. pp.173- 189.
- Torres A.C., Ze N.M., Cantliffe D.J. (2001) Abscisic acid and somatic induction of synchronous somatic embryo development of sweet potato. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:262–267.
- Trigiano R.N., Gray D.J., Conger B.V., McDaniel J.K. (1989) Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.*150:72–77.
- Trigiano R.N., May R.A., Conger B.V. (1992) Reduced nitrogen influences somatic embryo quality and plant regeneration from suspension cultures of orchardgrass. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:87–191.
- Trostle R. (2008) Global agricultural supply and demand: Factors contributing to the recent increase in food commodity prices. A Report from the Economic Research Service. United States Department of Agriculture Economic Research Service, Washington, DC.
- Tsujita T., Takaku T., Suzuki T. (2008) Chestnut astringent skin extract, an alpha-amylase inhibitor, retards carbohydrate absorption in rats and humans. *J. Nut. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. 54(1):82-8.
- Uden P., Robinson P.H., Wiseman J. (2005) Editorial: Use of Detergent System Terminology and Criteria for Submission of Manuscripts on New, Revised, Analytical Methods as well as Descriptive Information on Feed Analysis and/or Variability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118(3-4):181-186.

- Udensi E.A., Ekwu F.C., Isinguzo J.N. (2007) Antinutrient factors of vegetable cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. Pak. J. Nut. 6:194–197.
- Underwood E.J. (1981) Mineral nutrition of livestock. Common Wealth Agriculture Bureau, UK.
- Urbano G., López-Jurado M., Aranda P., Vidal-Valverde C., Tenorio E.J., Porres E. (2000) The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? J. Physiol. Biochem. 56:283–294.
- Urga K., Fite A., Kebede B. (1995) Nutritional and antinutritional factors of grass pea (*Lathyrus sativus*) germplasms. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 9:9-16.
- Vadivel V., Pugalenti M. (2008) Removal of antinutritional/toxic substances and improvement in the protein digestibility of velvet bean (*Mucuna pruriens*) seeds during processing. J. Food Sci. Tech. 45(3):242-246.
- Vaintraub I.A., Bulmaga V.P. (1991) Effect of phytate on the *in vitro* activity of digestive proteinases. J. Agric. Food Chem. 39:859–861.
- Valdebouze P., Bergeron E., Gaborit T., Delort-Laval J. (1980) Content and distribution of trypsin inhibitors and haemagglutinins in some legume seeds. Can. J. Plant Sci. 60:695–701.
- Van Arnold S.V., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L.H. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 69:233–249.
- Van Barneveld R.J. (1999) Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. Nut. Res. Rev. 12:203–230.
- Van der Klis J. D., Van Voorst A. (1993) The effect of carboxy methyl cellulose (a soluble polysaccharide) on the rate of marker excretion from the gastrointestinal tract of broilers. Poultry Sci. 72:503-512.

- Van Engelen F.A., De Vries S.C. (1993) Secreted proteins in plant cell cultures. *In* KA Roubelakis-Angelakis, K Tran Thanh Van, eds, Markers of Plant Morphogenesis. Plenum Press, New York, pp 181–200.
- Van Soest P.J. (1963a) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fibre residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Agr. Chem. J.* 46:825–829.
- Van Soest P. J. (1963b) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agr. Chem. J.* 46:829.
- Van Soest P.J. (1982) Nutritional ecology of ruminants. O. and B. Books Inc. Oregon (USA).
- Van Soest P.J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Winkle S.C., Johnson S., Pullman G.S. (2003) The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant Cell Rep.* 21:1175–1182.
- Vasanth K., Vivier M.A. (2011) Improved cryopreservation procedure for long term storage of synchronised culture of grapevine. *Biol Plant.* 55(2): 365-369.
- Vasic D., Alibert G., Skoric D. (2001) Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Scharader). *Plant Cell Rep.* 20:121.125.
- Ventura M.R., Flores M.P., Castanon J.I.R. (1999) Nutritive value of forage shrubs: *Bituminaria bituminosa*, *Acacia salicina*, and *Medicago arborea*. *Cas. Opt. Med.* 39:171–173.
- Verdeil J.L., Hocher V., Huet C., Grosdemange F., Escoute J., Ferriere N., Nicole M. (2001) Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann. Bot.* 88: 9-18.

- Vergne T., Maene M., Gabant G., Chauvet A., Debener T., Bendahmane M. (2010) Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv. Old Blush. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100:73–81.
- Vieitez A.M., San-José M.C., Corredoira E. (2011) Cryopreservation of zygotic embryonic axes and somatic embryos of european chestnut. *Methods Mol. Biol.* 710(3):201-213.
- Vioque J., Alaiz M., Girón-Calle J. (2012) Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions *Food Chem.* 132:67–72.
- Víteček J., Adam V., Petřek, Vacek J., Kizek R., Havel L. (2004) Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 79:195–201.
- Von Aderkas P., Label P., Lelu M.A. (2002) Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. *Tree Physiol.* 22:431–434.
- Vranová E., Inzé D., Van-Breusegen F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53(372): 1227-1236.
- Vroemen C., de Vries S., Quatrano R. (1999) Signalling in plant embryos during the establishment of the polar axis. *Sem. Cell Dev. Biol.* 10:157-164.
- Walker B.H. (1980) A review of browse in its role in livestock production in southern Africa. In: *Browse in Africa, the current state of knowledge.* (Ed.): H.N Le-Houerou, ILCA Addis Abbada, Ethiopia.
- Wang W.X., Yang H.J., Bo Y.K., Ding S., Cao B.H. (2012) Nutrient composition, polyphenolic contents, and in situ protein degradation kinetics of leaves from three mulberry species. *Lives. Sci.* 146:203–206.
- Wang X., Warkentin T.D., Briggs C.J., Oomah B.D., Campbell C.G., Woods S. (1998) Total phenolics and condensed tannins in field pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica* 101:97-102.

- Wang Y.H., Bhalla P. L. (2004) Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower, *Scaevola aemula* R. Br. *Plant Cell Rep.* 22:408–414.
- Wann S.R., Becwar M.R., Nagmani R., Feirer R.P., Johnson M.A. (1989) Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic calli of conifers. *Trees* 3:173-178.
- Werbrouck S., Eeckhault T., Debergh P. (1998) Somatic embryogenesis on anther filaments of *Spathiphyllum*. Libro resúmenes del 5TH Plant Embryogenesis Workshop y 2ND European Plant Embryogenesis Network Meeting P.18. Barcelona.
- Whetten R.W., MacKay J.J., Sederoff R.R. (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49: 585–609.
- Whitaker J.R. (1972) Principles of enzymology for food sciences. In: *Enzyme Inhibitors*. New York, Marcel Dekker Ltd. p. 255-282.
- Wilde H.D., Nelson W.S., Booij H., de Vries S.C., Thomas T.L. (1988). Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta* 176:205-211.
- Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox J.P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47:9–27.
- Willekens H., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995) Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1:207–228.
- Williams B.A., Verstegen M.W.A., Tamminga S. (2001) Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nut. Res. Rev.* 14:207–227.
- Williams E.G., Maheswaran G. (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinate behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57:443–462.

- Wink M. (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Gen.* 75:225–233.
- Wink M., Meissner C., Witte L. (1995) Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochem.* 38:139–153.
- Wise A. (1982) Blood lead levels after chronic feeding to mice of lead acetate with calcium phytate in the diet. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 29:550–553.
- Wood J.D., Richardson R.I., Nute G.R., Fisher A.V., Campo M.M., Kasapidou E., Sheard P.R., Enser M. (2003) Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66:21–32.
- Wu I.F., Chen J.T., Chang W.Ch. (2004) Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* “Gower Ramsey” *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 77:107-109.
- Xin W.J., Xu B., Wang G.D., Guo W.M., Wen F.D., Jin J.P. (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticult. Sinica* 33(6):1281-1286.
- Xu B., Huang L., Shen Z., Welbaum G.E., Zhang X., Zhao B. (2011) Selection and characterization of a new switchgrass (*Panicum virgatum* L.) line with high somatic embryogenic capacity for genetic transformation. *Sci. Horticult.* 129(4):854–861.
- Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T. (1998) Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:978–985.
- Yang A.F., Zhu Y. M., Hou A.J. (2003) Several factors affecting somatic embryos derived from cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus*),” *Plant Physiol. Com.* 39(3):206-208.
- Yang J.L., Seong E.S., Kim M.J., Ghimire B.K., Kang W.H., Yu C.Y., Li C.H. (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli

- (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100:49–58.
- Yang X., Zhang X. (2007) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29:36–57.
- Yang X.M., An L.Z., Xiong Y.C., Zhang J.P., Li Y., Xu S.J. (2008) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated plants in grapevine. *Biol. Plant.* 52(2):209-214.
- Yang Z.Y., Spencer P.S., Li Z.X., Liang Y.M., Wang Y.F., Wang C.Y., Li F.M. (2006) *Lathyrus sativus* (grass pea) and its neurotoxin ODAP. *Phytochemistry* 67:107-121.
- Yeung E.C. (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer, Dordrecht, pp 205-247.
- Yifei W., Gijon C., JiangWen F., HuaMing M., FuCheng L. (2009) Relationship between phenols and *in vitro* digestibility of six legume feeding shrubs. *Acta Pratul. Sini.* 18:32–38.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123:223–234.
- Yu C., Chen Z., Lu L., Lin J. (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplast isolated from embryogenic suspensions. *Pant Cell Tiss. Organ Cult.* 61: 51-58.
- Yu H.J., Oh Sk., Oh Mh., Choi D.W., Kwon Y.M., Kim S.G. (1997) Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.* 16:261-266.
- Yuan F.J., Zhao H.J., Ren X.L., Zhu S.L., Fu X.J., Shu Q.Y. (2007) Generation and characterisation of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max*L. Merr.). *Theor. Appl. Gen.* 115:945–957.

- Zahran H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:968-98.
- Zahran H.H., Marín-Manzano M.C., Sánchez-Raya A.J., Bedmar E.J., Venema K., Rodríguez-Rosales M.P. (2007) Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Mellilotus indicus* plants. *Physiol. Plant.* 131:122-130.
- Zavattieri M.A., Frederico A.M., Lima M., Sabino R., Arnholdt-Schmitt B. (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J. Biotechnol.* 13:1-9.
- Zdravković-Korać S., Milojević J., Tubić L., Čalić Dragosavac D., Mitić N., Vinterhalter B. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 101:237-244.
- Zdunek-Zastocka E., Lips H.S. (2003) Plant molybdoenzymes and their response to stress. *Acta Physiol. Plant.* 25:437-452.
- Zhang N., Fang W., Shi Y., Liu Q., Yang H., Gui R., Lin X. (2010) Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 103:325-332.
- Zhou J., Ma H., Guo F., Luo X. (1994) Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 36:73-79.
- Zhou J.R., Erdman J.W. (1995) Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 35:495-508
- Zimmerman J.L. (1993) Somatic embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1411-1423.
- Zouine I., El Hadrami I. (2004) Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. *Biotechnol.* 3(2):114-118.

Zraly Z., Pisarikova B., Trckova M., Herzig I., Juzl M., Simeonovova J. (2007)
The effect of white lupine on the performance, health, carcass characteristics
and meat quality of market pigs. *Vet. Med.* 52:29–41.