



**GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA**



**GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS**

CHARLA TÉCNICA

**“PRIMER CURSO INTERNACIONAL DE EMBRIOGENESIS
SOMATICA EN ESPECIES TROPICALES”**

**ISELA ESCUDERO BRAVO
Técnico Agrícola
Biotecnología Frutales**

SANTIAGO, 27 DICIEMBRE 2004

GENERALIDADES DEL CULTIVO *IN VITRO*

A los años 1902 se remontan los primeros intentos de realizar cultivar de células aisladas de plantas por Haberlandt, quién postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica de la que se sostienen todas las técnicas del cultivo *in vitro*

Para lograr las herramientas necesarias y hacer posibles los avances, como el desarrollo de los medios de cultivos y el conocimiento de los reguladores de crecimiento se tubo que esperar varios años, porque recién a finales los años 50 estuvieron disponible. Y desde ese momento se comenzó una serie de acontecimientos, como la regeneración de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert, 1958; Steward y col., 1958) y consecutivamente la demostración de que estos embriones somáticos se originaban a partir de células aisladas (Backs-Husemann y col., 1970; Reinert et al, 1971), los cuales confirmaron totalmente la capacidad de totipotencia de las células vegetales.

El cultivo de tejido puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales.

Dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado, sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Nash y Davies, 1972; Komamine y col., 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martín, 1955), la propagación masiva (Vasil, 1994; Kito, 1997), la conservación de germoplasma (Withers, 1985), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Pérez y col., 1998) y la ingeniería genética (Herrera-Estrella y col., 1983).

A partir de los logros obtenidos en la regeneración de plantas *in vitro* se ha desarrollado toda una producción de micropropagación, que se inició por los países desarrollados de Europa y Estados Unidos y que actualmente se ha ampliado al resto del mundo incluyendo a países de América Latina , Asia y Africa.

Las técnicas de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas, se han visto favorecidas también por el avance del cultivo de tejido y la principal limitante para el manejo de un mayor número de especies han sido los pocos recursos de sistemas de regeneración para los genotipos de mayor relevancia comercial.

EL CULTIVO DE TEJIDO Y SUS APLICACIONES

PLANTAS LIBRES DE PATÓGENOS

Se podría decir que esta fue la primera aplicación práctica de las técnicas del cultivo *in vitro*. Desde que se hizo la primera demostración mediante la cual se manifestó que a través de el cultivo de meristemos podrían aislarse zonas de tejidos que escapan a la infección viral y que existía la posibilidad de regenerar plantas libres de virus (Morel y Martín, 1955), se abrió el camino para remediar el grave problema que constituye la obtención de material de propagación libre de enfermedades especialmente en las especies de propagación agámica, en las que la acumulación de enfermedades sistémicas son la causa principal en la baja de los rendimientos y en muchos casos la eliminación de grandes variedades de la explotación comercial.

Obtener plantas libres de patógenos es la base de la propagación masiva de plantas, además se puede multiplicar rápidamente el material de siembra.

Por lo tanto se debe asegurar la total sanidad de los explantes iniciales, la estrategia más sencilla es tomar los explantes previamente diagnosticados como libres de enfermedades.

No siempre se puede contar con plantas saneadas y para esto es necesario recurrir a un grupo de técnicas para sanearlas. Entre ellas la más eficiente es el cultivo de meristemos, la termoterapia, la quimioterapia y la más reciente es la electroterapia (Hernández y col., 1995). Las últimas tres técnicas se pueden utilizar combinando o no con el cultivo de meristemos. Sin embargo, la eficiencia en la eliminación de enfermedades va a depender en gran medida del tipo de agente infeccioso que se pretenda sanear.

PROPAGACIÓN MASIVA

Sin duda, la multiplicación de plantas ha sido la más popular de las aplicaciones de el cultivo *in vitro*, sus bases fueron establecidas desde los años 50 y 60 y fue realmente en las décadas de el 70 y 80 que se estableció una verdadera industria de micropropagación (Kiitto, 1997).

Las principales ventajas de este procedimiento de propagación se pueden resumir en:

- Altos números de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos períodos de tiempo.
- Rápida introducción de nuevas variedades o clones
- Producción independiente de las condiciones ambientales.-
- Aumento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Uniformidad en las plantas producidas.
- Mayor facilidad en la comercialización.

La formación de brotes a partir de ápices, yemas o meristemas y la subsecuente regeneración de plantas, es el sistema más sencillo de multiplicación *in vitro* y son más de mil especies en las cuales se ha logrado establecer esta técnica (Murashige y Huang, 1987). Por lo que estos resultados no corresponden a nivel de laboratorio con la cantidad de especies que son propagadas a escala comercial y esto se debe a muchas razones, desde protocolos no eficientes para la multiplicación, enraizamiento y aclimatización, la baja calidad de las plantas resultantes de el proceso hasta los precios no competitivos en comparación con otros métodos de propagación vegetativa (Kitto, 1997). Muchas veces no se han alcanzado los resultados esperados de esta industria.

El desafío actual de los propagadores de plantas está en la disminución de los costos y la diversificación de las producciones ampliando el rango de especies favorecidas por esta tecnología, por lo que es necesario la utilización al máximo de las reservas que todavía tienen los sistemas basados en la propagación vía organogénesis, la automatización y el desarrollo de procedimientos más eficientes de regeneración de plantas basados en la embriogénesis somática (Vasil, 1994).

MEJORAMIENTO A TRAVES DE MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN *IN VITRO*

Las aplicaciones del cultivo *in vitro* por mejoramiento genético no se limitan a una sola técnica, como se ha hecho popular en muchas publicaciones. El cultivo de órganos, tejidos y células, abrió nuevas perspectivas también al utilizar la mutagénesis y el incremento de la eficiencia en los métodos de selección al poder emplearse a nivel de callos o células, lo que ofrece la posibilidad de manipular millones de individuos en volúmenes reducidos de espacios y poder enfrentarlos a agentes selectivos como son las toxinas de los microorganismos (Carlson, 1973; Daub, 1986; Gómez, 1996).

El trabajar con células o protoplastos permite una mayor eficiencia en la selección, ya que la población celular recibe de manera uniforme la misma presión de selección, sin embargo esto es imposible de lograr en cultivo de callos, ápices o yemas en medios de cultivo sólido, en el que solo una parte del tejido está en contacto con el medio selectivo. De esta forma se brinda a toda la población sometida al tratamiento mutagénico la posibilidad de expresar la resistencia al factor de selección.

INGENIERÍA GENÉTICA

Las técnicas de transformación genética de plantas han experimentado un imponente impulso en las dos últimas décadas, debido a la unión de los adelantos en la biología molecular y el cultivo *in vitro*.

Existen varios sistemas que pueden ser utilizados para introducir genes foráneos en plantas. En los que se incluyen los métodos indirectos basados en la utilización de *Agrobacterium* (Herrera-Estrella y col., 1983; Fraley y col., 1983; Bevan y col.,

1983) y los métodos directos como la electroporación (Shillito y col., 1985; From y col., 1986), bombardeo de micropartículas (Stanford y col., 1987) y microinyección (Crossway y col., 1986; Aly y Owens, 1987, Toyoda y col., 1988). El primer método ha hecho posible la transformación de especies que son susceptibles a la bacteria mediante la infección de explantes foliares y posterior regeneración vía organogénesis.

La electroporación y la microinyección se han visto limitadas por la dificultad de establecer la regeneración desde protoplastos, si bien, la posibilidad de transformar células intactas mediante electroporación ya ha sido demostrada (Arencibia y col., 1995; Barbón, 1997). La transformación vía pistola de genes rompe estas barreras, sin necesitar el desarrollo de sistemas refinados de regeneración para conseguir transformantes.

En todos estos procedimientos lo común que tienen, es que la transformación siempre ocurre en células aisladas, en cambio la regeneración puede ser de origen unicelular o multicelular, lo más común que existe en la regeneración vía organogénesis, es que se produce la formación de plantas quiméricas.

Las plantas quiméricas, crean un estorbo en cualquier proceso de mejoramiento genético (Pérez y col., 1998). Por lo que para la transformación genética ideal sería hacer la transformación, por medio de embriogénesis somática. Otra posibilidad es hacer la transformación sobre agregados multicelulares pro-embriogénesis (PEM's) cultivados en medio líquido y su multiplicación hacerla en uno o dos subcultivos antes de pasarlos al medio de inducción de embriones.

Sin embargo, todavía existen limitantes para el establecimiento de dichos protocolos de regeneración en la gran mayoría de los cultivos, de ahí que pueden evaluarse otras variantes que puedan también minimizar la aparición de quimeras como es la embriogénesis repetitiva a partir de embriones somáticos transformados por *Agrobacterium* o por métodos directos, debido a que los embriones que se forman durante la embriogénesis repetitiva pueden ser de origen unicelular, por lo que al hacer varios ciclos de embriogénesis repetitiva permitiría la formación de embriones completamente transformados (Parrot y col., 1991).

EMBRIOGENESIS REPETITIVA O PROPAGACIÓN MASIVA

Una de las características de la embriogénesis somática es la multiplicación indefinida (Merkle y col., 1996). En el medio líquido este fenómeno constituye una poderosa herramienta, con un gran potencial para la propagación masiva y también puede ser usada para la transformación genética, especialmente cuando no se desea pasar para la regeneración por la etapa de formación de callos.

Este sistema puede ser modificado para la propagación masiva usando técnicas de micropropagación más avanzadas, como los Biorreactores. Aumentando así el número de plantas a obtener desde un solo embrión somático y disminuyendo los costos de producción.

Por ejemplo: de 100 mg de embriones en estado globular en 50 mL de medio basal Murashige-Skoog (1962) modificado. Se ha alcanzado una cantidad de hasta 60.000 embriones en 80 mL de medio de cultivo en un agitador orbital o zaranda. (esto se ha logrado en banano Musa AAA cv Gran Enano) y (este sistema se ha usado en el Instituto de Biotecnología de las plantas IBP).

EMBRIOGENESIS SOMATICA

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat y col., 1979).Y esto no es un fenómeno artificial y en la naturaleza se conoce como una forma de apomixis llamada embriónía adventicia, descrita por primera vez por Strasburgues en 1878. Aunque fueron Reinert y col., quienes describieron la embriogénesis somática, por primera vez el año 1958.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Este método es considerablemente apreciado como el más eficaz para la producción masiva de plantas *in vitro*.

El desarrollo de un método experimental para la regeneración de plantas por medio de la embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Inducción de los embriones somáticos
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación y Conversión en plantas

CARACTERÍSTICAS DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa.

Según Sannasgala (1989), Escalant y Teissont (1989) el embrión somático presenta las siguientes características.

-Tiene independencia frente al tejido generador (protegido normalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene unión vascular con el tejido que le dió origen, por lo que fácilmente pueden ser separados de este.

- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledoinal.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

Según Parrot(1993), la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta origen del explante.

Morfológicamente un embrión somática es muy similar a un embrión cigótico, especialmente en su desarrollo evolutivo desde pro embrión, fase globular, corazón, torpedo y cotiledonar o embrión maduro, esto es en el caso de las especies dicotiledóneas.

La embriogénesis somática es afectada por varios factores tales como:

- El genotipo de la planta
- El tipo y estado fisiológico del explante
- Los reguladores de crecimiento
- Las condiciones del cultivo

INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de la embriogénesis somática radica en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo estos remplazados con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante, las cuales pudieran dar lugar a la embriones somáticos. Cuyo concepto fue planteado por primera vez por Evans y col., (1981); Sharp y col., (1984), quienes usaron los siguientes términos:

“Inducción de la embriogénesis en determinadas células” (IEDC) para describir una embriogénesis que tuvo origen en una célula no embriogénica.

“Células somáticas determinadas preembriogénicamente”(CsDPE) para describir aquellas células desde embriones cigótico de plantas, las que siempre expresan un programa de expresión de los genes embriogénicos.

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática depende si el tejido del explante que esta formado o consiste en CsDPE o CsNE (célula somática no embriogénica).

“CsDPE”: Un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante, este proceso es llamado embriogénesis somática directa. Es decir la formación de embriones somáticos directamente desde una estructura organizada tales como segmentos de embriones cigóticos o embriones cigóticos completos y/o tallos (Williams y Maheswaran, 1986).

"CsNE": Las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan origen a un callo, aunque también se obtienen a partir de suspensiones celulares y protoplastos. Este proceso es llamado embriogénesis somática indirecta y es usado para indicar que una fase se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos.

Una de las cosas importantes para la inducción de la embriogénesis somática es la culminación de la salida del gen a los genes del patrón de expresión permitiendo su reemplazamiento con el programa de la embriogénesis. Una de las posibilidades para regular la baja expresión de los genes es la metilación del ADN, la que ha sido correlacionada con la cantidad de auxina exógena presente en el medio de cultivo. Lo que hace que un tratamiento de estrés que permitan mantener baja la regulación de la expresión de los genes del tejido del explante, pueden también estimular la embriogénesis somática. Se han utilizado diferentes técnicas, como estrés con calor, aumento de la concentración de iones de hipoclorito, anaerobiosis, temperaturas bajas 4 grados Celsius y también la exposición a la auxina (Merkle y col., 1996).

EMBRIOGENESIS SOMATICA INDIRECTA

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una es conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (E.S.B.F.) y la otra se denomina como embriogénesis somática de alta frecuencia (E.S.A.F.). En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón, torpedo y maduro), mientras que en la segunda, los embriones somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque estos grupos aparecen en un número menor de callos. Por ejemplo, en el caso del café (*Coffea arabica*), al que se refirió anteriormente, tal como en los bananos y plátanos (*Musa spp.*).

FACTORES QUE CONTROLAN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA DE ALTA FRECUENCIA.

La característica más común de la embriogénesis somática de alta frecuencia para muchos cultivos, es la presencia de un tejido embriogénico que se diferencia a partir de células individuales llamadas células embriogénicas madres y otra característica general de estos sistemas, es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo debido a la alta relación auxina/citoquinina durante la división celular y la baja relación entre estos componentes durante la fase de diferenciación (Söndahl y col., 1991). Estos autores afirman que en el café se

pueden reconocer las siguientes fases de la embriogénesis somática de alta frecuencia.

- a- Medio de inducción (división celular y redeterminación).
- b- Medio de acondicionamiento (diferenciación).
- c- Rescate del embrión (aislamiento).
- d- Germinación del embrión (crecimiento del brote y de la raíz).
- e- Fortalecimiento de la plántula.
- f- Transferencia a suelo.

Además se han identificados, varios factores generales que controlan este proceso:

- a- Los tejidos donantes (especies vegetales o variedades, la fuente del explante y el pretratamiento del explante).
- b- El medio de cultivo (constituyentes orgánicos e inorgánicos, concentraciones y tipos de reguladores del crecimiento y osmolaridad total).
- c- Las condiciones del crecimiento (calidad, intensidad y duración de la luz, rango de temperatura, intercambio gaseoso, régimen de subcultivos y la selección de tejidos durante los subcultivos).

Otro sistema de embriogénesis somática indirecta son los cultivos de suspensiones celulares, los cuales son establecidos habitualmente por la transferencia de fragmentos de callos indiferenciados o embriones somáticos en estadíos jóvenes a medio de cultivo líquido, los que posteriormente son agitados durante todo el período de cultivo. Estos sistemas son ampliamente usados como un modelo para estudiar los caminos de la producción de metabolitos secundarios, inducción de enzimas y expresión de genes, representando la base para el escalado del cultivo en los Biorreactores.

Existen algunos problemas que la producción de embriones somáticos a partir del cultivo de células en suspensión:

- Bajo índice de la mitosis en las células.
- Agregados celulares grandes.
- Potencial embriogénico.

Varios autores plantean que durante el cultivo, el potencial morfogénico disminuye con el tiempo y se incrementa la producción de estructuras anormales (Street, 1977; Denchev, 1987).

EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA

A través de este sistema existe la posibilidad de lograr embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callos. Este se logra por medio de la función generada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante.

La embriogénesis somática directa brinda un número de aplicaciones potenciales:

- 1.- Clonado directamente de híbridos comerciales F1 para especies donde el material puede ser vendido como plantas jóvenes para trasplante a campo. El sistema ideal debe tener una continua embriogénesis directa desde los embriones sexuales F1 con un período de cosecha de los embriones somáticos obtenidos para lograr su crecimiento y desarrollo en plantas.
- 2.- Clonado rápido de un material (stock) de apreciado valor para el mejoramiento, en el estado más temprano posible de su ciclo de vida después del cruzamiento.
- 3.- Selección "*in vitro*" y mejoramiento de genotipos para diferentes caracteres de plantas completas en el estado más temprano posible de su ciclo de vida.
- 4.- Generación de plantas jóvenes de clones de especies fuera del mejoramiento donde cada semilla representa un genotipo diferente.
- 5.- Mecanización y automatización de la propagación microclonal mediante el uso del sistema de Biorreactores.

Actualmente se trabajado mucho para estudiar diferentes fuentes de explantes y su efecto en la producción de embriones somáticos.

Los embriones somáticos pueden ser conseguidos desde varias fuentes de cultivos tales como: hojas jóvenes, hojas inmaduras, inflorescencias, peciolos entre otros. La reacción del explante para la embriogénesis esta determinada por la edad de este, así como la concentración de auxinas empleada. Una fuente similitud ha sido establecida entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de 2,4-D en el proceso de desdiferenciación y diferenciación "*in vitro*" (Denchev y Atanassov, 1989 y Denchev y col., 1990).

BIBLIOGRAFÍA

- Aly, M.A.M. y Owens, L. 1987. A simple system for plant cell microinjection and culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10:159-174.
- Arencibia, A.; Molina, P.; De La Riva, G.; Selmán-Housein, G. 1995. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Reports*. 14:305.
- Backs-Husemann, D. y Reinert, J. 1970. Embryubildung durch isoilierte einzelzellen aus gewebeulturen von *Daucus carota*. *Protoplasma* 70: 49-60.
- Barbón, R. 1997. Transformación genética del café (*Coffea arabica* L. Var Caturra rojo mediante electroporación de suspensiones celulares embriogénicas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las plantas. Universidad Central de Las Villas. 86 p.
- Bevan, M.; Flavell, R.B.; y Chilton, M.D. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as selectable marker for plant cell transformations. *Nature*, 304: 184-186.
- Carlson, P.S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180: 1366-1368.
- Crossway, A.; Oakes, J.V.; Irvine, J.M.; Ward, B.; Knauf, V.C. y Shwemaker, C.K. 1986. Integration of DNA following microinjection tobacco mesophyll protoplast. *Mol. Gen. Genet.* 202: 179-185.
- Daub, M.E. 1986. Tissue culture and the selection of resistant to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 159-186.
- Denchev, P. 1987. Development of an experimental model for *in vitro* selection of herbicide resistance in alfalfa *Medicago falcata*. Ph. D. Thesis. Inst. Genetics, ANS. Moscow.
- Denchev y Atanassov, A. 1989. Effect of atrazine on the viability and embryo formation. *European Societes of Plant Physiology. Yugoslavia.* p. 1407.
- Denchev; Velcheva, M.; Dragijska, R.; Kuklin, A. Y Atanassov, A. 1990. Somatic embryogenesis in *Medicago*. *Biotekhnol. Biotekh.* 5-6.p. 66-70.
- Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Sanders, P.; Flick, J.; Adams, S.; Bitter, M.; Brand, L.; Fink, C.; Fry, J.; Gallipi, G.; Golverg, S.; Hoffmann, N. y Woo, S. 1983. Expresión of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4810.
- Fromm, M.E.; Taylor, L.P. y Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 319: 791-793.

Gómez, R. 1996. Selección *in vitro* a la enfermedad carbón de la caña azúcar (*Ustilago scitaminea* Syd). Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. 95 p.

Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitz-Ver. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. (Wiend) 111 (1): 69-92.

Hernández-Estrella, L. Depicker, A.; Van Montagu, M. y Schell, J. 1983. Expresión of chimeric genestransfered into plant cells ussing a Ti-plasmid derived vector. Nature. 303: 209.

Kitto, S.L. 1997. Comercial micropropagation. Hort Science. Vol. 32 (6).

Komamine, A.; Morigaki, T.M. y Fujimura, T. 1982. Metabolism in synchronous growth and diferentiation in plant tissue and cell cultures. En: Frontiers of plant tissue culture. Torpe, T.A. (ed). Calgary, Canada. p. 159-168.

Misawa, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural services bulletin 108. 87 p.

Molle, F.; Dupuis, J.M.; Anselm, A.; Crolus- Savidan, I.; Petiard, v. And G. Freyssinet. 1993. Carrot somatic embryogenesis and its application to syntetic sedes. En: Synseeds. Aplicacions of syntetic seed to crop improvement. Redenbaugh, K. (ed). 15: 257-287.

Morel, G. y Martín, C. 1955. Guerison de pomme de terre de maladie a virus. C. R. Acad. Sci Paris. p. 1315- 1324.

Muraschige, t and L.C. Huang, 1987. Cloning plants bi tissue culture: Early years, current status and future prospects. Acta Hort. 212:639-643.

Merkle, S.; Parrott, W. Y Flinn B. 1996. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. Torpe, T. *In vitro*. Embryogenesis in plant. p. 155-203.

Nash, D.T. y Davis, M. E. 1972. Some aspects of growth and metabolim of Paul's Scarlet rose cell suspencions. J. Exp. Bot 23:75-91

Pérez Ponce, J. ; Jiménez, E. y Gomez, R. 1998. Field performance of celetd sugarcane (*Saccharum spp* híbrids) mutants. En: Somaclonal variation and indused mutation in crop improvement. S.M.Jain, D.S.Brar, B. S. Ahloowalia (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Plublichers p. 449-464.

Reinert, J. 1958, Untersuchugen über die mophogenese und gewebwkulturen. Ver Dtsch. Bot. Ges 71:15.

Reiner, J.; Backs-Husemann, D. y Zerban, H. 1971. Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. Coll. Natl. C.N.R.S.(Paris): 261-268

Sanford, J.C.; Klein, T.M.; Wolf, E.D. y Allen, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. and Tech.*, 5:27-37.

Shillito, R.D.; Saul, M.W.; Paskowski, J.; Muller, M. y Potrykus, I 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotechnology* 3:1099-1103.

Steward, F.C.; Mapes, M.O. y Meras, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Armer. J. Bot.* 45:705-708.

Sharp, W.; Evans, D.; Ammirato, P.; Yamada, Y. 1983. *Plant cell and Tissue culture. Principles and Applications.* Ohio State University Press. 892 p.

Söndahl, M. Nacamura, T. y Sharp, W. 1991. Propagación *in vitro* del café En: Roca, W. y Mroginski, L. (Eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura.* 27.p. 621-642.

Street, H. y Withers, L. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. In *Tissue culture and plant Science.* Street, H. Academic Press, London. New York.p. 71.

Toyoda, H.; Matsuda, Y.; Utsumi, R. y Ouchi, S. 1988. intranuclear microinjection for transformations of tomato callus cells. *Plant Cell Reports* 7:293-296.

Tiserat, B.; Esan, E. y Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1.p.1-78.

Vasil, I.K. 1994. Automation in plant propagation . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2):105-108.

Withers, L.A. 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. En: *Plant cell culture: a practical approach.* R.A. Dixon (ed). IRL Press, Oxford.p.169-191.

Williams, E. y Maheswaran, M. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany.* 57.p.443-462.

CONCLUSIÓN

La embriogénesis somática es una técnica diferente a la propagación in vitro tradicional, el cual se basa en el germinación de embriones para propagación masiva y un sistema muy eficaz , para la obtención de un elevado número de plantas en menor tiempo.

Es una de las forma de optimizar el sistema de embriogénesis somática mediante el uso de Biorreactores que se basan en propagación masiva de embriones utilizando para ello contenedores con flujo de medio líquido que permite la oxigenación y nutrición del embrión.

Otra tecnología que se puede lograr con la embriogénesis somática, es que se puede obtener una semilla artificial o sintética, a través del encapsulado con alginato de calcio y conservarlas por años.

La embriogénesis somática es una técnica que permite la transformación genética la cual se puede realizar a gran escala, para alcanzar el mejoramiento genético.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS (IBP)

SANTA CLARA, CUBA

CONTACTOS :

Dr. Manuel de Feria, Subdirector del IBP y Director del Programa de Biorreactores.

Email: mdeferia@ibp.uclv.edu.cu

Dra. Marisol Freire Seijo, Jefa del Laboratorio de Embriogénesis Somática y Transformación Genética. Además es Embajadora de Proyectos de Intercambio.

Email: mfreire@ibp.uclv.edu.cu

Dr. Raúl Barbón Rodríguez, Jefe de la biofábrica, del Sistema de Inmersión Temporal, del Laboratorio de propagación, del Departamento de Producción Vegetal y especialista en Transformación Genética.

Email: raul@ibp.uclv.edu.cu

MSc. José Machado, Jefe del Departamento de Biología Molecular, del Laboratorio de Biotecnología y Bioseguridad.

Email: jmachado@ibp.uclv.edu.cu

Dra. Leyanis García Águila, Microbióloga Jefa del Departamento de Fitopatología del IBP.