

Aspectos básicos de la embriogénesis somática

Marisol Freire Seijo

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: mfreire@ibp.co.cu; marisol_freire@yahoo.es

RESUMEN

En el presente trabajo de una manera clara y asequible para el lector se describen conceptualmente una serie de reconocidos eventos que ocurren durante el desarrollo del proceso de embriogénesis somática. Una de las características sobresalientes de los embriones somáticos es que surgen de células somáticas y por lo tanto presentan la potencialidad de producir duplicados de un genotipo específico. Esta característica no solo permite la propagación clonal, tanto en especies propagadas vegetativamente como por semillas; sino también la multiplicación de células somáticas a las cuales se les han introducido genes específicos por ingeniería genética. Los individuos genéticamente modificados pueden ser multiplicados en forma segura y eficiente, evitando los riesgos de la incorporación de genes extraños meióticamente inestables en el resto del germoplasma. La propagación de plantas, a través de la embriogénesis somática, representa el método más eficiente de multiplicación clonal de plantas que se ha desarrollado hasta la fecha. La embriogénesis somática como sistema de regeneración de plantas ha sido empleada para la propagación de plantas y como herramienta para la conservación, y el mejoramiento genético de germoplasmas. No obstante, su empleo para la propagación comercial aún es escaso. Una posible explicación de este fenómeno a nivel mundial está relacionada, en primer lugar, con el desconocimiento que aún existe sobre la biología del proceso de embriogénesis somática, aunado a la no disponibilidad de sistemas eficientes y repetibles de regeneración.

Palabras claves: maduración, germinación, conversión, variación somaclonal

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento. La primera demostración de que las plantas podían producir embriones somáticos *in vitro* fue publicada en 1958 (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958). Este es un hecho bien establecido en más de 200 especies de importancia agronómica. Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, de tejidos reproductivos, de embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de las partes de las plantas (Copeland y McDonald, 1995).

La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Esta técnica permite incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los costos de producción y da la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (de Feria, 2000). Este trabajo aborda de manera general las principales definiciones y consideraciones relacionadas con la embriogénesis somática, y más específicamente, en las Poaceas. Se reflejan, además, algunas experiencias del

colectivo de investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas lo que da un complemento práctico a la reseña.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, descrita por primera vez por Strasburgues en 1878 aunque fueron Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958) quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática en el año 1958.

Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método (Yeung *et al.*, 1996).

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye las siguientes etapas:

- Inducción de los embriones somáticos
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación
- Conversión

Origen de la embriogénesis somática

Existen varias teorías acerca del origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos. Algunas referencias señalan el incuestionable origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Street y Withers, 1974; Haccius, 1977), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams y Maheswaran, 1986). Los factores que determinan si un embrión somático ha tenido un origen uni o multicelular no han sido dilucidados aún.

Una hipótesis es que el tejido con células somáticas determinadas preembriogénicamente da lugar a embriones con orígenes multicelulares y un tejido con células inducidas embriogénicamente da lugar a embriones con origen unicelular (Williams y Maheswaran, 1986), pero pueden ser encontradas suficientes excepciones dentro de esta teoría. Otra posible explicación puede ser que el embrión somático primario tenga un origen multicelular y posteriormente los embriones somáticos originados desde este embrión primario tengan un origen unicelular. Por ejemplo, Hartweek *et al.* (1988) encontraron embriones somáticos originados desde grupos de células en cotiledones de embriones cigóticos de *Glycine max* (L.) Merr (Soya). También Sato *et al.* (1993) en trabajos con soya hicieron referencia a la formación de embriones a partir de embriones somáticos en estado globular donde las nuevas estructuras se formaban a partir de una sola célula. Igual origen ha sido observado por Polito *et al.* (1989) durante la formación de embriones somáticos secundarios en la especie *Aleuritis* sp. L. (Nuez de nogal).

De manera general las células de las que se derivan los embriones somáticos muestran características comunes a las células en activa división, las cuales son de tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucleolo prominente, vacuola pequeña y profusión de gránulos de almidón. Según William y Mahescuaran (1986) sus propiedades histoquímicas y ultraestructurales sugieren una intensa síntesis de ARN y actividad metabólica.

Características de la embriogénesis somática

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) y Escalant y Teissont (1989) el embrión somático presenta las siguientes características:

- Es una estructura bipolar con un ápice radical, uno apical y cotiledones.
- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

Parrott (1993), afirmó que 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 fuente del explante.

Evidentemente los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material vegetal. Estos son los siguientes:

- El genotipo de la planta (Rodríguez – Otubo *et al.*, 2000).
- Las condiciones de cultivo (Bornhoff y Harst, 2000).
- Los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo (Perrin *et al.*, 2001).
- El tipo y estado fisiológico del explante (Fiore, 2002).

La naturaleza misma de la embriogénesis somática permite su aplicación en sistemas de cultivo líquido. Los mismos regeneran una mayor cantidad de material vegetal uniforme y el procedimiento es de gran valor para acelerar los métodos de mejoramiento genético clásico, pues permitirían lograr una multiplicación de variedades de híbridos intraespecíficos.

ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Fases de la embriogénesis somática

Se han observado detalles morfológicos que han revelado la existencia de cuatro fases. Las fases cero, uno, dos y tres pueden ser reconocidas desde los estados tempranos de la embriogénesis en el sistema descrito por Fujimura y Komamine (1980) en *Daucus carota* L. (zanahoria).

Durante la fase cero, las células aisladas sufren continuas divisiones hasta formar los agregados celulares embriogénicos con la presencia de auxina en el medio de cultivo. En la fase uno, los agregados de células formados desde las células aisladas ganan

la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada del medio de cultivo, dando lugar al estado uno de agregado celular. En la fase uno, la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los tres días después de transferido a medio de cultivo sin auxina. Después de la fase uno ocurre una rápida división a los tres o cuatro días de cultivo en ciertas partes del agregado celular, dando lugar a la formación del embrión en etapa globular; esta fase es designada fase dos. La siguiente fase (fase dos), es inducida por la transferencia de los agregados celulares en estado uno a un medio de cultivo libre de auxina. En la misma ocurre una rápida división celular en ciertas partes del agregado debido a la polarización de la síntesis de ADN, dando lugar al embrión globular y su suspensor en la zona que no ocurrió división. En la fase final (fase tres), las plantas dicotiledóneas continúan el desarrollo del embrión en las etapas de corazón y torpedo.

Para las especies monocotiledóneas existen las fases cero, uno y dos; pero la fase tres no, pues no se diferencian las etapas de corazón y torpedo, sino que el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por las etapas de escutelar y coleoptilar (Fujimura y Komamine, 1980).

Inducción de la embriogénesis somática

La inducción exitosa de los embriones somáticos y su final conversión en plantas viables no es rutina eficiente para la mayoría de las especies (Merkle *et al.*, 1995).

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La expresión temporal y espacial de los genes es fuertemente regulada para permitir la diferenciación de varios sistemas de órganos, así como el desarrollo de una planta. La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo esto reemplazado con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante que pudieran dar lugar a embriones somáticos. Este concepto fue planteado por primera vez por Evans *et al.* (1981) y Sharp *et al.* (1984), quienes usaron los términos siguientes:

-Inducción de la embriogénesis en determinadas células (IEDC) para describir una embriogénesis celular que tuvo origen en una célula no embriogénica.
-Células somáticas determinadas preembriogénicamente (CsDPE) para describir aquellas células de embriones cigóticos de plantas, las cuales siempre expresan un programa de expresión de los genes embriogénicos.

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen de si el tejido del

explante está formado o consiste en CsDPE o CsNE (célula somática no embriogénica).

En el primer caso:

- 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, o sea, 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 presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo, aunque también se pueden obtener 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.

Uno de los eventos iniciales para la inducción de la embriogénesis somática es la terminación de la salida del gen o los genes del patrón de expresión lo que permite su reemplazamiento con el programa de la embriogénesis. Un posible mecanismo para regular la baja expresión de los genes es la metilación del ADN, la cual ha sido correlacionada con la cantidad de auxina exógena presente en el medio de cultivo; por lo cual tratamientos 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 empleado diferentes técnicas tales como: estrés con calor, anaerobiosis, temperaturas bajas (4.0°C) y también la exposición a la auxina (Merkle *et al.*, 1995).

Las aplicaciones de inhibidores de la producción de etileno como los cationes cobalto (Co²⁺) y de los cationes de plata (Ag⁺) impiden la formación de los embriones. Los resultados obtenidos por Fuentes *et al.* (2000) indican que el etileno desempeña un papel importante en la regulación de la embriogénesis somática de *Coffea canephora* P.

Nomuna y Komamine (1995) plantearon una hipótesis en la que el nivel endógeno de auxinas provocaba la polaridad de la masa embriogénica, lo cual es indispensable para la inducción de la embriogénesis somática. Las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad de la masa embriogénica al difundirse dentro de la misma, lo que induce la inhibición del proceso embriogénico iniciado por las auxinas endógenas, por lo que esta hipótesis postula que las auxinas juegan un doble rol. Las auxinas y específicamente el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) es empleado por Puigderrajols *et al.* (2001) para inducir la embriogénesis somática en *Quercus suber* L.

La inducción de la embriogénesis somática activa rutas de control genético similares a las que presenta la embriogénesis cigótica, lo cual se puede considerar como un fenómeno universal para todas las plantas; sin embargo genotipos individuales dentro de una especie muestran capacidad embriogénica variada. Tales diferencias genotípicas en la capacidad embriogénica son el reflejo de diferencias en la activación de elementos importantes en la ruta embriogénica.

Durante la inducción de la embriogénesis somática pueden ocurrir dos sucesos diferentes: que un estímulo de la división celular sea suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante o que los embriones somáticos se formen a partir de suspensiones celulares, protoplastos o que medie la formación de un callo. Dichos fenómenos se describen seguidamente.

Embriogénesis somática directa

Esta ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante.

La embriogénesis somática directa ofrece un número de aplicaciones potenciales, entre las que se pueden citar:

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

Embriogénesis somática indirecta

El fenómeno de la embriogénesis somática indirecta fue observado por primera vez en suspensiones celulares de zanahoria por Steward *et al.* (1958) y a partir de callos que crecían en medio de cultivo semisólido por Reinert (1958).

La embriogénesis somática indirecta ha sido descrita en especies como *Arachis hypogaea*, *Daucus carota*, *Papaver orientales*, *Vitis vinifera* (Blanckaert *et al.*, 2000) y *Musa spp* (Gómez *et al.*, 2002) por solo citar algunas.

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF). 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 evolucionan completamente hasta las etapas avanzadas de desarrollo. 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 dichos grupos aparecen en un número menor de callos.

Para muchos cultivos una característica común de la embriogénesis somática indirecta de alta frecuencia es la presencia de un tejido embriogénico que se diferencia a partir de células individuales llamadas células embriogénicas madres. 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 *et al.*, 1991).

Se han identificado, además, varios factores generales que controlan este proceso:

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

Otra forma de manifestarse la embriogénesis somática indirecta son los cultivos de suspensiones celulares embriogénicas. Estos son establecidos generalmente por la transferencia de fragmentos de callos indiferenciados o embriones somáticos en etapas iniciales a medio de cultivo en estado líquido. Estos posteriormente son colocados en agitación durante todo el período de cultivo. Este tipo de cultivo es un sistema modelo para estudiar las rutas de la producción de metabolitos secundarios, inducción de enzimas y expresión de genes y representa la base para el escalado del cultivo en los biorreactores.

Existen algunos problemas que limitan 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.

Según Denchev (1987) durante el cultivo *in vitro* el potencial morfogénico disminuye con el tiempo y se incrementa la producción de estructuras anormales.

SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de agregados celulares (de 2.0 a 100 células), distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento. Este sistema de cultivo es un poderoso implemento para llevar a cabo estudios sobre la inducción de la embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo, así como la obtención de diversos productos secundarios tales como algunos fenoles, antequinonas, antocianina, nicotina, etc. Además las células en suspensión pueden ser empleadas en el mejoramiento genético, especialmente por la posibilidad que ofrece esta técnica de regenerar plantas a partir de las células mutadas y formar, por consiguiente, plantas mejoradas que pueden ser seleccionadas posteriormente por métodos tradicionales o mediante métodos biotecnológicos (Sato *et al.*, 1993).

La formación de embriones somáticos en suspensiones celulares fue observada por primera vez en zanahoria (*Daucus carota* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Dudits *et al.*, 1991), estas son las dos especies en las que se han realizado más estudios.

Las suspensiones celulares se han obtenido en múltiples especies vegetales, la regeneración de plantas a partir de ellas puede ser vía organogénesis y/o embriogénesis.

Inicio y establecimiento de suspensiones celulares

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de inóculos tales como: mesófilo de hojas o fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993), transfiriendo porciones de callos al medio de cultivo líquido y embriones inmaduros como en el plátano (Barranco, 2001) El primero de ellos tiene la desventaja de que las suspensiones no pueden ser mantenidas en cultivo por largos períodos de tiempo, siendo necesario prepararlas frescas para cada experimento.

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión a partir de fragmentos de callos depende de la calidad del tejido caloso. Al combinar la calidad

del callo y la velocidad de agitación las células se separan unas de otras con relativa facilidad. Este aspecto está muy relacionado con las propiedades de la pared celular, las cuales pueden ser modificadas al variar algunos componentes del medio de cultivo, como son los reguladores del crecimiento, las sales minerales como el calcio y el hierro, los azúcares y las vitaminas como B1, B12 y E.

Las altas concentraciones de auxinas y bajas de citoquininas en el medio de cultivo mejoran esta propiedad. El grado de separación de las células varía con un cambio de reguladores del crecimiento o con la concentración de azúcares. Las combinaciones de reguladores del crecimiento deben ser tratadas con extremo cuidado pues la presencia de una puede negar la acción de la otra (Vázquez y Torres, 1981).

La utilización de callos como material vegetal inicial para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas ha impedido la exitosa explotación de esta tecnología (embriogénesis somática). Por ello, se ha comenzado a implementar una nueva técnica en la que se utiliza directamente el medio de cultivo líquido *per se* y la adición de cantidades de auxina o mezclas de ellas, lo que ha hecho posible la formación de masas proembriogénicas y la multiplicación de éstas. El tejido utilizado puede ser seleccionado a partir de hojas, tallos, secciones de hipocotilo, pétalos, meristemos apicales, ovarios y embriones cigóticos, tubérculos y filamentos de anteras. Esta técnica ha sido utilizada fundamentalmente en plantas dicotiledóneas como *Lycopersicum sp.* L. (tomate), zanahoria, *Carica papaya* L. (papaya), *Brasica oleracea* L. (col) y *Allium sativum* L. (ajo) (Holst *et al.*, 1996). Aunque en especies monocotiledóneas como caña de azúcar y bananos se han empleado también (Freire, 2001 y Chong, 2003).

Por otra parte el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), auxina muy utilizada en la formación de embriones somáticos, puede producir variabilidad genética y aunque los mecanismos de dicha variabilidad no se han determinado, parecen estar expresados por una afectación de la división celular que provoca mutaciones cromosomales. La ocurrencia o no de estas variaciones genéticas depende de la cantidad de los reguladores del crecimiento y el tiempo de exposición a que se somete el tejido vegetal (Merkle *et al.*, 1995).

El cultivo en suspensión se establece después de un período de adaptación en el medio de cultivo líquido de los callos y las células. A esta etapa se le denomina también etapa de desagregación, en ella los callos, debido a la acción del movimiento del medio de cultivo líquido, liberan células. Al dividirse estas el cultivo queda compuesto por células aisladas, agregados celulares de diversos tamaños, fragmentos residuales del inóculo y reminiscencias de células

muertas conformando así la suspensión (Carman, 1990). El tiempo de desagregación, generalmente, se extiende de 15 a 35 días en dependencia del cultivo y la cantidad de inóculo inicial. Luego de este período, es necesario eliminar los residuos de callos y grandes agregados celulares ya que comienzan a aparecer células no embriogénicas que entorpecen el desarrollo de la suspensión (Evans *et al.*, 1981).

Según Gómez (1998) el medio de cultivo más empleado en el mundo para el crecimiento y desarrollo de las células en suspensión es el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (se continuará refiriendo como MS) el cual se utiliza en cultivos como la caña de azúcar, cafeto, bananos, plátanos, papa etc. También el medio de cultivo propuesto por Gamborg *et al.* (1968) (B5) se reconoce por su aplicación en el cultivo *in vitro* de especies de importancia agrícola.

Las células embriogénicas inicialmente forman grupos de células pequeñas, referidas como masas embriogénicas, por tanto una suspensión celular embriogénica está formada por una mezcla compleja de diferentes tipos de células, de las cuales un gran porcentaje completan la transición de células somáticas a células embriogénicas (De Vries *et al.*, 1988).

En los cultivos de suspensiones celulares se utilizan plataformas rotatorias con el objetivo de ayudar a la dispersión de las células y al intercambio de gases, para el manteniendo de las células vivas. Las condiciones óptimas para el máximo crecimiento y dispersión de las células varían de una especie a otra, pero la velocidad de agitación apropiada para la mayoría de los cultivos es de 60-150 r.p.m. La velocidad de agitación depende del cultivo en particular, el medio de cultivo utilizado, tipo de frasco y el volumen del medio de cultivo relacionado con el tamaño y forma del frasco de cultivo. Generalmente se adicionan entre 15 y 20 ml de medio de cultivo en Erlenmeyer de 100 ml o entre 30 y 50 ml para Erlenmeyer de 250 ml (Merkle *et al.*, 1995).

Mantenimiento de la suspensión celular embriogénica

Una vez establecida la suspensión celular es indispensable determinar cuál es el momento donde las células han agotado los componentes del medio de cultivo, o al menos algunos de ellos. Debido a su crecimiento y metabolismo, se hace necesario en este momento adicionar medio de cultivo fresco para continuar sus procesos fisiológicos normales. A esto se le denomina subcultivo. El momento en que debe de realizarse el subcultivo se determina a través de la curva de crecimiento de la suspensión, donde las células muestran una dinámica de crecimiento o división similar a la de los microorganismos y vive independiente del tejido que le dio origen (Gómez, 1998).

Las fases descritas en la curva de crecimiento son:

- Fase inicial o de latencia.
- Fase exponencial.
- Fase lineal.
- Fase estacionaria.

Durante la fase inicial el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales para posteriormente iniciar e incrementar la velocidad de división celular durante la fase exponencial y lineal. En la fase exponencial a medida que el crecimiento continúa, las células alcanzan su máxima división; las células son jóvenes y biológicamente activas. Si se realiza un subcultivo en esta fase el crecimiento continúa a velocidades logarítmicas (Shigeta *et al.*, 1996).

En la fase de estacionaria el alto número de células determina que se vayan agotando los nutrientes del medio de cultivo, las materias residuales tóxicas se acumulan, el pH se modifica, la transferencia de energía disminuye y las células se obstaculizan mutuamente, la velocidad de división va disminuyendo gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, momento en que se han agotado los nutrientes, o al menos algunos de ellos. Durante esta fase las células han alcanzado su máxima densidad celular, permanecen viables pero sin división, para más tarde morir muchas de ellas. Por tanto los subcultivos deben ser realizados antes de que la suspensión llegue a esta fase (Gómez, 1998).

El período de tiempo entre la iniciación del cultivo y la fase estacionaria está determinado primeramente por:

- Densidad celular inicial.
- Duración de la fase de latencia.
- Incremento proporcional de la línea de células.

La mínima o crítica densidad inicial de células para lograr el crecimiento de una nueva suspensión celular depende de:

- El genotipo que se cultiva.
- De la duración e incubación del inóculo que se utiliza.
- Composición del medio de cultivo.

Formación de agregados embriogénicos

La formación de agregados embriogénicos es influenciada por factores como la densidad celular, la disposición de nutrientes y los reguladores del crecimiento que se le adicionan al medio de cultivo.

Según Schoof *et al.* (1999) la frecuencia de los subcultivos puede afectar el grado de agregación de las células. Frecuentes transferencias de medio de cultivo ocasionan una activa división celular, lo cual puede resultar en un incremento de la formación de agregados celulares embriogénicos. El incremento de la formación de agregados celulares durante el período de máxima división celular se debe al alto

índice de mitosis en los agregados celulares y la menor división de las células aisladas. Por ejemplo, el mayor número de agregados en zanahoria, plátanos y bananos se observó tempranamente durante la fase de crecimiento exponencial (Gómez, 1998).

El patrón de crecimiento de una suspensión celular depende de la densidad celular por mililitros de medio de cultivo a inocular. Con una densidad de inóculo baja, el crecimiento es muy lento o no ocurre. Por otra parte, si la densidad es muy alta la fase estacionaria se reduce, pero con esto el porcentaje de crecimiento cesa tempranamente, comienzan a morir rápidamente muchas células (Falco *et al.*, 1996). La exacta relación entre densidad de inóculo y patrón de crecimiento varía entre las distintas especies.

Formación de embriones somáticos

Para inducir la formación del embrión somático a partir de los proembriones es necesario adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de auxina o auxinas menos fuertes e incluso no adicionar auxinas, especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas. En algunas especies es necesario adicionar una citoquinina (Nomura y Komamine, 1995).

Existe una hipótesis que relaciona el nivel endógeno de auxinas con la polaridad de las masas embriogénicas. Las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad al difundirse dentro de las masas embriogénicas provocando la inhibición del proceso iniciado por las auxinas endógenas. Esta hipótesis refiere que el papel de las auxinas es doble (Nomura y Komamine, 1995).

La densidad celular utilizada en una suspensión influye, además, en el comportamiento asincrónico de los embriones somáticos, siendo esto uno de los aspectos más importantes a resolver pues como se conoce, sólo los embriones que se encuentran en etapas más avanzadas del proceso de histodiferenciación, son capaces de germinar y dar lugar a plantas completas.

De Jong *et al.* (1992) señalaron algunos aspectos que influyen en la asincronía, ellos son: la cantidad de nutrientes que un embrión somático puede tomar del medio de cultivo, la posible interacción entre los embriones y la concentración en que se encuentren los elementos de acondicionamiento liberados por los propios embriones somáticos al medio de cultivo.

Otro aspecto de interés es que el uso del verapamil o de la nifedipina que favorecen el bloqueo de los canales del calcio y por tanto inhiben la formación del embrión. Esto sugiere que el calcio exógeno favorece la formación y desarrollo de los embriones somáticos, los cuales tienen un alto contenido de

este elemento particularmente en las etapas globular y torpedo (Timmers *et al.*, 1996).

Maduración de embriones somáticos

La etapa de maduración es un complejo período de desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y se adquieren tolerancia a la desecación (Parrot, 1993).

En términos de nutrición es fundamental tener en cuenta los suplementos del medio de cultivo como las auxinas, los carbohidratos, el nitrógeno y el ABA (ácido abscísico) (Frenando y Gamage, 2000).

La presencia de nitrógeno en el medio de cultivo se garantiza con la adición de nitratos, amonios, aminoácidos y caseína hidrolizada.

McKersie y Bowley (1996) encontraron que la adición de prolina como suplemento del medio de cultivo favorece el número de embriones en estados avanzados y el tamaño de los embriones de *Medicago sativa* L. (alfalfa); mientras la glutamina y la arginina sólo incrementan el tamaño del embrión.

La correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de los embriones somáticos lo que indica una alta calidad en el vigor e influye positivamente en su posterior germinación (Fuji *et al.*, 1990).

La adición de ABA durante la etapa de maduración del embrión promueve la acumulación de sustancias de reserva; esto, seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático. Sin embargo, en algunas especies no es necesaria la desecación para lograr una buena germinación (Arcioni y Mariotti, 1982; Kott y Beversdorf, 1990).

Germinación y conversión en plantas de embriones somáticos

En la mayoría de los trabajos realizados se hace poca distinción entre los procesos de germinación y conversión (Merkle *et al.*, 1995). No teniendo en cuenta que la germinación solo se refiere al desarrollo de la raíz y/o el brote.

Pocos análisis bioquímicos y fisiológicos han sido hechos para comparar los patrones de germinación de embriones cigóticos y somáticos. Las reservas de proteínas y lípidos en el embrión somático declinan sustancialmente a partir del primer día en condiciones de imbibición o bien antes de la elongación de la raíz (Cry *et al.*, 1991). La degradación tan rápida de las sustancias de reserva en el embrión somático, la cual es diferente en un embrión cigótico, es probablemente el

resultado de la falta del tejido nutritivo que rodea a la semilla; es por esto que las plantas de embriones somáticos son más pequeñas y débiles que las de semilla. También juegan un papel importante en la germinación la adición de citoquininas en el medio de cultivo, las cuales contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y la proliferación.

En ocasiones al colocar los embriones somáticos directamente de las condiciones de maduración a germinación se alcanzan pobres resultados en cuanto a la germinación de los mismos (Parrot *et al.*, 1988 y Senaratna *et al.*, 1990). Esto sugiere el empleo de tratamientos postmaduración para mejorar la germinación de los embriones somáticos, como por ejemplo bajas temperaturas (Das *et al.*, 2002).

La habilidad del embrión somático para la germinación se ha descrito y se han caracterizado aspectos importantes que influyen en esta fase; pero se ofrecen muy pocos datos sobre la conversión en plantas.

Al proceso de desarrollo de plantas completas en condiciones *ex vitro* a partir de embriones somáticos se le denomina conversión y es esencial para los últimos eventos de un sistema basado en la embriogénesis somática. La conversión de los embriones somáticos difiere entre los genotipos, las especies y los sistemas de cultivo.

Existen evidencias de que, al igual que en el proceso de formación de los embriones somáticos, el proceso de conversión también está regulado por la acción génica; pero esta regulación es independiente del control que realizan los genes sobre la embriogénesis somática.

La manipulación de los embriones cigóticos *in vitro* simulando los procesos que ocurren en las plantas de forma natural, es la mejor vía para optimizar la maduración y conversión en plantas de los embriones somáticos.

El tiempo y el tipo de aplicación de los reguladores del crecimiento, baja concentración de oxígeno y desecación de los embriones maduros; son tratamientos que pueden incrementar la eficiencia en la producción de plantas (Carman, 1989).

La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Anandarajah y McKersie 1990; Fuji *et al.*, 1990; Senaratna *et al.*, 1990). Para calificar la eficiencia de un protocolo de regeneración de plantas vía embriogénesis somática debe tenerse en cuenta el porcentaje de embriones somáticos que convierten en plantas y no restringir este valor

solamente a los embriones somáticos que germinan.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN POACEAS

Al iniciarse los trabajos de embriogénesis somática las especies monocotiledóneas y dentro de ellas las Poaceas eran consideradas recalcitrantes por su comportamiento en cada una de las etapas del proceso embriogénico. Seguidamente se describen aspectos específicos de la embriogénesis somática en estas especies.

En la mayoría de las Poaceas la embriogénesis somática y la regeneración de plantas puede ser obtenida por el cultivo de tejidos embriogénicos. Algunos autores como Guiderdoni (1986a) sugiere utilizar hojas jóvenes de plantas *in vitro*, otros como Ho y Vasil (1983a); Ahloowalia y Maretzki (1983) y De García (1988) emplean hojas jóvenes pero de plantas crecidas en campo o invernadero; estos estudios los han efectuado en diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido).

Guiderdoni (1986a) puso en evidencia la existencia de un gradiente de callogénesis en caña de azúcar el cual está en dependencia de la posición de las hojas y concluyó que las hojas A y B (las más cercanas al meristemo) son las formadoras de callos nodulares embriogénicos. Anteriormente Ho y Vasil (1983a) observaron, en esta misma especie, algo similar. Liu (1992, 1993) estudió también la formación de embriones a partir de inflorescencias inmaduras de caña de azúcar y Javier *et al.* (1992) lo hicieron a partir de embriones cigóticos inmaduros.

Cuando se utilizan hojas jóvenes, el grado de respuesta embriogénica disminuye a medida que los tejidos son más maduros. Se ha establecido un claro gradiente de respuesta desde la base hasta el ápice. Esto fue encontrado también en segmentos de hojas en los que el tejido vascular estaba completamente diferenciado (Haydu y Vasil, 1981; Liu y Vasil, 1981 y Ho y Vasil, 1983a).

Estudios histológicos comprueban que las primeras divisiones celulares se producen cerca del tejido vascular pues se presume existan en esta zona altos niveles de reguladores del crecimiento y nutrientes. De acuerdo con la experiencia acumulada en varias especies de Poaceas el factor más importante en la respuesta morfogénica de los cultivos ha sido el estado fisiológico y de desarrollo del explante.

La reacción del explante para la embriogénesis está determinada por la edad de éste, así como la concentración de auxina empleada. Una fuerte correlación ha sido establecida entre el estado de

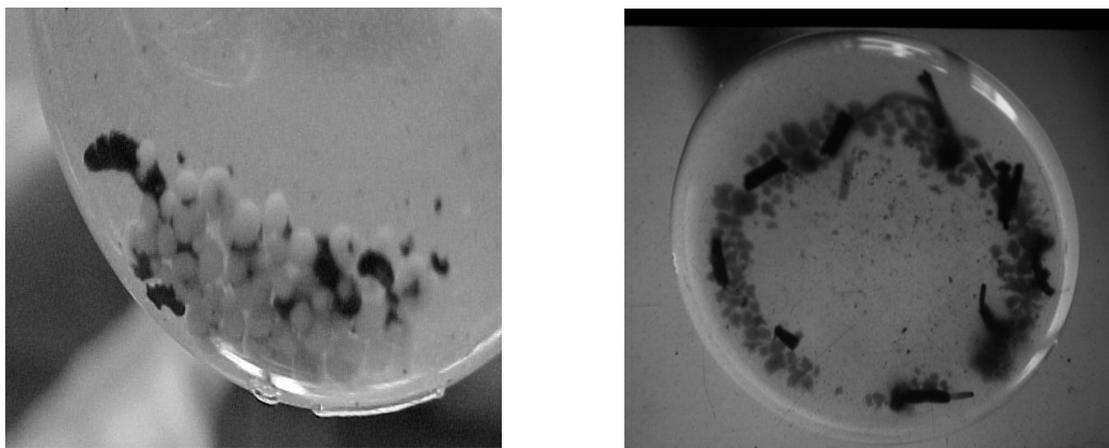


Figura 1. Empleo de medios de cultivo líquidos durante la inducción de la embriogénesis somática en las especies plátanos (izquierdo) y caña de azúcar (derecho).

desarrollo del explante inicial y la concentración de 2,4-D en el proceso de desdiferenciación y diferenciación *in vitro* (Denchev y Atanassov, 1988 y Denchev *et al.*, 1990).

Dado que la embriogénesis somática es un proceso eminentemente regulatorio, es de vital importancia la concentración de auxinas para el crecimiento de los callos y la formación de los embriones. Algunas células en presencia de auxinas adquieren totipotencia, forman grupos proembriogénicos y pasan a la etapa globular. Lukse *et al.* (1996) plantearon que las células vegetativas pueden modular las proteínas que se unen a auxinas en respuesta a la presencia del regulador, mientras que las embrionales no pueden hacerlo.

Nadar *et al.* (1978), Liu y Chen (1982), Ho y Vasil (1983a, 1983), Ahloocualia y Maretzki (1983), Guiderdoni (1986a, 1986b), Srinivasan y Vasil (1986) y Guiderdoni y Demarly (1988), indujeron la embriogénesis somática en callos y suspensiones celulares de caña de azúcar mediante modificaciones del medio de cultivo MS y con 2,4-D como regulador de crecimiento.

El 2,4-D es el regulador de crecimiento más empleado para inducir la embriogénesis somática. Sin embargo, investigadores como Fitch y Moore (1990) y Brisibe *et al.* (1994), han utilizado de forma eficiente otras auxinas como Dicamba y Picloran. Evidentemente los tipos de reguladores de crecimiento y las concentraciones que se empleen dependen mucho del genotipo con que se trabaje y el tipo de explante utilizado.

La discriminación entre callos con estructuras embriogénicas y callos no embriogénicos no suele ser difícil para investigadores de experiencia, a pesar de ello los estudios citológicos ofrecen una garantía total durante las determinaciones. En las Poaceas y en general en todas las especies, los callos suelen presentarse de color amarillo

pálido, compacto y de apariencia nodular (Creemers-Molenaar *et al.*, 1988 y Aftab *et al.*, 1996).

En pocas especies ha sido obtenido el cultivo de células regenerables, entre ellas, *Zea mays* L. (maíz), *Oryza sativa* L. (arroz.), *Sorghum saccharatum* L. Moench (millo) y caña de azúcar (Vasil, 1988). Sin embargo, los cultivos embriogénicos en medios de cultivo líquidos son los que permiten el escalado productivo de la embriogénesis somática (Figura 1).

Las células embriogénicas ya desarrolladas en el callo o en las suspensiones celulares pueden fácilmente perder su naturaleza embriogénica si los niveles de 2,4-D bajan de lo requerido, aparecen entonces células alargadas y vacuoladas. La regresión de estas células a células meristemáticas no se conoce. En las suspensiones celulares esto coincide con el final de la fase exponencial de la curva de crecimiento, donde después de alcanzar el máximo número de células meristemáticas, se produce una rápida lisis y muerte de ellas, lo que probablemente es debido a la disminución de los nutrientes y sustancias reguladoras del crecimiento, particularmente del 2,4-D, que causa agrandamiento de las células, vacuolación y senescencia (Vasil y Vasil, 1982, 1984). La transferencia de las células a un medio de cultivo fresco restaura la división celular y el crecimiento de las células meristemáticas. Similares observaciones fueron hechas en suspensiones embriogénicas de *Saccharum officinarum* (Ho y Vasil, 1983b).

En muchos casos la disminución brusca del nivel de 2,4-D, desata el inicio del proceso embriogénico. Para la mayoría de las Poaceas no es posible la eliminación total de esta auxina de forma continua durante el proceso para propiciar la división de las células (Brisibe *et al.*, 1993).

Las plantas en el cultivo *in vitro* son selectivas a la concentración y la forma química de los iones

presentes en los medios de cultivo. Para la caña de azúcar, se recomienda el empleo de las sales MS (Gnanapragasam y Vasil, 1990; Liu, 1992; Taylor *et al.*, 1992; 1993; Brisibe *et al.*, 1993 y Sánchez *et al.*, 1997), sin embargo otros en minoría proponen la utilización del medio de cultivo N6 (Fitch y Moore, 1990, 1993; Brisibe *et al.*, 1994 y Matsuok *et al.*, 1995).

La embriogénesis somática se produce indistintamente en medios de cultivo semisólidos y líquidos, estos últimos resultan ser los más favorables pues son la antesala para la producción de embriones a escala de biorreactores.

Los callos de caña de azúcar formados previamente en medio de cultivo semisólido pueden ser utilizados para establecer las suspensiones celulares, en las

que inicialmente aparecen simultáneamente células parenquimatosas, meristemáticas y agregados proembriogénicos. Para eliminar esta heterogeneidad en las suspensiones, Taylor *et al.* (1992) realizaron diluciones en las suspensiones finas cada tres o cuatro días por la transferencia de 10 ml de suspensión celular a 25 ml de medio de cultivo fresco. Liu (1992) también se basó en el efecto de las subtransferencias o subcultivos continuos para homogenizar la composición celular (Figura 2).

Las suspensiones celulares embriogénicas pueden tener de 10-20 millones de células.ml⁻¹, este crecimiento se mantiene por subcultivos con intervalos que dependen del genotipo estudiado. En la figura 3 se muestra la influencia de la densidad celular inicial empleada en los subcultivos sobre el comportamiento de la curva de crecimiento celular (Freire, 2001).

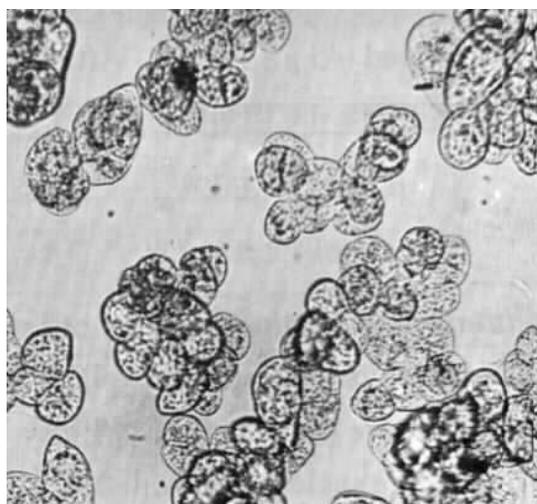


Figura 2. Efecto de los subcultivos en una suspensión celular embriogénica de caña de azúcar en fase de multiplicación de los agregados embriogénicos.

Generalmente la regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares en la caña de azúcar se obtiene al colocar sobre medio de cultivo semisólido alícuotas de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas (Taylor *et al.*, 1992) o heterogéneas (Castillo, 2001). De esta forma Gnanapragasam y Vasil (1990) obtuvieron hasta 92% de eficiencia en la regeneración de plantas y Liu (1993) sólo obtuvo plantas a partir del 30% de los agregados celulares. Sin embargo, lo ideal sería madurar los embriones en medios de cultivo líquido y posteriormente colocarlos en medios de cultivo semisólido para su germinación. Muy pocos investigadores hacen referencia u obtienen buenos resultados en la germinación de los embriones, tal es así que Vasil y Vasil (1984) y Díaz *et al.* (1992) plantean que la regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares de Poaceas resulta rara.

De manera general, los medios de cultivo para la maduración y germinación de los embriones tienen disímiles composiciones. Existen algunos muy simples como el empleado por Brisibe *et al.* (1993)

que sólo utilizaron las sales MS y sacarosa 4.0% y Fitch y Moore (1993) que utilizan las sales MS y 10% de agua de coco. Otros no son tan simples y contienen incluso mezclas de varios reguladores del crecimiento, por ejemplo Gnanapragasam y Vasil (1990), utilizan un medio de cultivo compuesto por las sales MS, 3.0% de sacarosa, 0.13 mg.l⁻¹ de 2,4-D, 0.23 mg.l⁻¹ de 6 BAP, 0.25 mg.l⁻¹ de kinetina y similar concentración de zeatina. Liu (1993) adicionó en el medio de cultivo ANA, 2 iP y 0.05 mg.l⁻¹ de ABA, este último para evitar la germinación precoz y favorecer la asimilación de nutrientes correctamente.

Variación somaclonal

Al analizar muestras de hojas *in vitro* de caña de azúcar se ha demostrado que esta planta presenta mosaicismo cromosómico *in vitro*. Por estas razones se ha planteado que la variabilidad somaclonal tiene las mayores perspectivas en las especies de multiplicación vegetativa, en las cuales la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas no la afecta debido también a que son altamente poliploides.

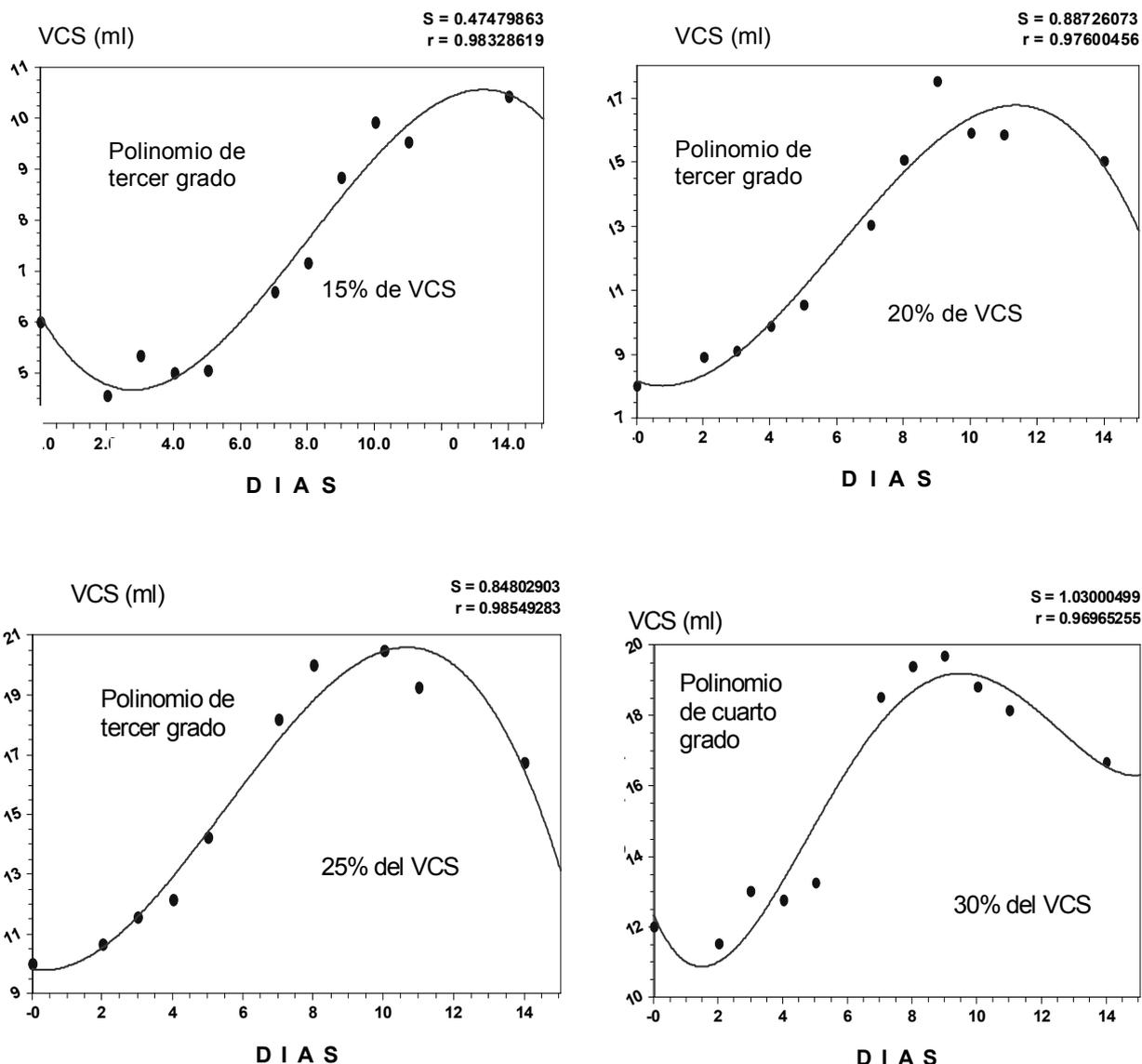


Figura 3. Influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de suspensiones celulares de caña de azúcar durante 14 días (Freire, 2001).

En caña de azúcar, Lourens y Martin (1987) compararon plantas regeneradas de yemas axilares y de callos organogénicos y encontraron que para las dos variedades estudiadas las plantas de callos tuvieron una variación mayor que las de yemas y estas mayor que las de esquejes en la fase de caña planta. Estas variaciones se manifestaron como hábitos anormales de crecimiento, que incluyeron el número de tallos, altura del tallo, posición de la hoja y diámetro del tallo. Sin embargo, en el segundo año estas diferencias prácticamente desaparecieron, lo cual demuestra que fueron cambios temporales y presumen que deben ser aún menores en la siguiente generación. Pérez *et al.* (1998) también refieren la disminución de la magnitud de la variación observada en caña planta con respecto a los retoños y las propagaciones clonales de plantas regeneradas de callos organogénicos, concluyendo que para el

mejoramiento genético no debe analizarse la fase de plantín para los caracteres cuantitativos.

Las plantas propagadas *in vitro*, como resultado del rejuvenecimiento o cambios temporales, muestran variaciones tales como incremento en el número de tallos o ramas, retardo en la floración, aumento de la susceptibilidad a una enfermedad y otras características, las cuales influyen en el rendimiento en el campo (Evans, 1986).

En el caso específico de la caña de azúcar se ha observado que las principales alteraciones relacionadas con el rendimiento han sido el incremento en el número de tallos, aumento del vigor, reducida habilidad para florecer y mayor susceptibilidad a la roya (Peros y Bonnel, 1990; Jiménez 1995; Pérez, 1998).

Las plantas propagadas *in vitro* han mostrado una menor incidencia de enfermedades sistémicas (raquitismo, escaldadura, VMCA) que de las semilla tradicional (Anderlini y Kotska, 1986; Jackson *et al.*, 1990; Flynn y Anderlini, 1990). No obstante, Peros y Bonnel (1990) han señalado que las plantas micropropagadas muestran una mayor susceptibilidad a la roya, lo cual puede estar asociado a cambios fisiológicos temporales inducidos por el proceso de cultivo *in vitro*.

Las experiencias de los investigadores cubanos han demostrado que la propagación *in vitro* es un sistema efectivo para combatir las enfermedades sistémicas que afectan la caña de azúcar, con ventajas adicionales respecto al rendimiento agrícola debido al efecto combinado del saneamiento y el rejuvenecimiento; el programa nacional de producción de semilla por biotecnología así lo ha demostrado (Pérez *et al.*, 1998).

Se ha determinado que la aparición o no en mayor o menor medida de posibles variantes somaclonales está muy condicionada a los protocolos de trabajo que se apliquen y no a los propios eventos que tienen lugar durante los diferentes procesos de regeneración (Jiménez, 1995).

Vasil (1987) afirmó que las plantas regeneradas vía embriogénesis somática pudieran tener una menor variación somaclonal que las plantas regeneradas por otras vías *in vitro*; sin embargo, esta afirmación no ha sido apoyada con datos.

Brar y Jain (1998) plantearon que los mecanismos de la variación somaclonal no están totalmente claros y probablemente se deban a cambios en el número y estructura de los cromosomas, reordenamientos cromosómicos, la amplificación del DNA, deleciones, transposomas y la metilación del DNA. Los cambios epigenéticos también ocurren frecuentemente; se ha demostrado que este tipo de variación no segrega a la progenie ni cumple las leyes de la herencia (Pérez, 1987) y surgen posiblemente porque la duplicación de las células en un cultivo en suspensión se alcanza entre las 20 y las 60 horas (Wilson, 1980), por lo que el riesgo de alteraciones genéticas es potencialmente mayor, pudiéndose originar euploidías o aneuploidías en el material cromosómico de la célula.

Según Jain (1997) la aparición de la variación somaclonal está condicionada por la ocurrencia de uno o varios factores que actúan de forma simultánea en el cultivo *in vitro*.

Es de esperar, al igual que en la micropropagación vía yemas axilares, una fuerte influencia del genotipo en la variabilidad y en los distintos componentes del rendimiento, lo cual debe ser determinado con el

estudio de un mayor número de genotipos y las generaciones clonales de estas plantas.

El uso comercial de la embriogénesis somática para la propagación de plantas es extremadamente reducido si se compara con el número de especies vegetales en las que se han desarrollado protocolos eficientes de regeneración de plantas, por esta vía. Entre las causas que conducen a este fenómeno se puede citar la falta de repetibilidad en los protocolos desarrollados, el desconocimiento de las bases bioquímicas y fisiológicas del proceso, la necesidad de profundizar en los estudios de estabilidad genética de las plantas regeneradas y por último deben de superarse las limitaciones que aun existen en la automatización del proceso.

REFERENCIAS

- Aftab, F, Zafar Y, Malik K y Iqbal J (1996) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* ssp. Hybrid cv. Col-54). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 71-78
- Ahloocualia, B y Maretzki A (1983) Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Rep.* 2: 21-25
- Anandarajah, K y McKersie B (1990) Enhanced vigour of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. *Plant Sci.* 71: 261-266
- Anderlini, T y Kostka S (1986) Initial yield responses of kleentek tissue culture produced seed cane in Louisiana. *Proceeding of the XIX ISSCT Congress.* Louisiana. EUA
- Arcioni, S y Mariotti D (1982) Tissue culture and plant regeneration in the forage legumes *Onobrychis viciaefolia* Scop., *Carolina varia* and *Lotus corniculatus* L. *Plant Tissue Culture.* Fujiwara. A. De Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo
- Assani, A, Haicour G, Wenzel F, Cote F, Bakry B, Foroughi-Wehr G, Ducreux M, Aguillar y Grapin A (2001) Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp.; Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20: 482-488
- Barranco LA (2001) Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara
- Blanckacrt, A, Belingheri A, Vasseur J y Hilbert J (2000) Changes in lipid composition during somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. *Plant Science* 157: 165-172
- Bornhoff, BA y Harst M (2000) Establishment of embryo suspension cultures of grapevines (*Vitis* L.). *Vitis* 39: 27-29
- Brisibe, E, Miyake H, Taniguchi T y Maeda E (1994) Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *New Phytol.* 126: 301-307
- Brisibe, E, Nishioka D, Miyake H, Taniguchi T y Maeda E (1993) Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. *Plant Science.* 89: 85-92
- Carman, J (1989) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial simulation of the in-ovulo oxygen, growth regulator and desiccation environments. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 175: 417-424

- Carman, J (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26: 746-754
- Castillo, R (2001) La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Bioplantas. Ciego de Ávila
- Chong, B, (2003) Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de banano cultivar gran enano (*Musa* AAA). Tesis presentada en opción al grado científico de Master en Biotecnología Vegetal. UCLV. IBP. Santa Clara
- Copeland, L y McDonald M (1995) Principles of Seed Science and Technology. 3ª edition pp.400-409. Chapman & Hall. New York
- Creemers-Molenaar, J, Loeffen J y Van der Valk P (1988) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *PlantSci.* 57: 165-172
- Cry, D, Webster, F y Roberts D (1991) Biochemical events during germination and early growth of somatic embryos and seed of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex). *Seed. Sct. Res.* 1. 91-104
- Das, D, Reddy M, Upadhyaya K y Sopory, SK (2002) An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 991-1005
- De García, E (1988) Variaciones somaclonales y su aplicación en los estudios de mejoramiento genético de la caña de azúcar. En: Villegas L (Ed.) Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. IDEA. Caracas
- De Fera, M (2000) Empleo de biorreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara
- De Jong, A, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A y De Vries, S (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell.* 4: 425-433
- 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, P y Atanassov A (1988) Effect of atrazine on the viability and embryo formation. *European Societies of Plant Physiology.* Yugoslavia. 1407
- Denchev, P, Velcheva M, Dragijska R, Kuklin A y Atanassov A (1990) Somatic embryogenesis in *Medicago*. *Biotekhnol. Biotekh.* 5-6: 66-70
- Dennis, J, Trigiano N y Conger V (1993) Liquid suspension culture production of Orchardgrass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. En: Redenbaugh, K (Ed.) Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement. 351. Calgene, Inc. Daris. California
- De Vries, S, Booiij H, Cordewener J, Van Angelen F, De Jong A, Van Kammen A, Lo Schiavo F, Schellekens G, Sterk P y Terzi M (1988) Carrot somatic embryogenesis suspends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes and Development* 2: 462-476
- Díaz, E, Niubó E, Korneva S y Maribona R (1992) Embryogenic cell suspensions of sugarcane. Libro de reportes cortos del Congreso Biotecnología Habana 92. Avances en Biotecnología Moderna. 1: 14-13
- Dudits, D, Boger L y Gyorgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the análisis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*, J, *Cell Sci.* 9: 475-484
- Escalant, J y Teissont C (1989) Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7: 665-668
- Escalant, J, Teissont C y Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.) *In vitro* *Plant Cell and Dev. Biol.* 30: 181-186
- Evans, D, Sharp W y Flick C (1981) Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: *Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture.* Thorpe, T (Ed) pp. 45-113. Academic Press. New York
- Falco, M, Januzzi B y Tulmann A (1996) Cell suspension culture of sugarcane, growth, management and plant regeneration. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8 (1): 1- 6
- Fernando, S y Gramage C (2000) Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L). *Plant Science* 5: 193- 198
- Fiore, S, De Pasquale F, Carimi F, Carimi F y Sajeve M (2002) Effect of 2, 4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of citrus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 57-63
- Fitch, M (1986). N₆ medium for long-term regeneration of friable, embryogenic callus cultures. *Hawaii Sugar Plant Assoc. Exp. Stn. Ann. Rep.* 1985: 7-8
- Fitch, M y Moore P (1990) Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 157-163
- Fitch, M y Moore P (1993) Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 335-343
- Flynn, L y Anderlini T (1990) Disease incidence and yield performance of tissue culture-generated seed cane over the crop cycle in Louisiana, J, Amer, Soc, Sugar cane Tech. 10:113-122
- Fuentes, S, Calheiros M, Manetti-Filho J, Vieira L (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydratesources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 5-13
- Fuji, J, Slade D, Olsen R, Ruzin S y Redenbaugh K (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci.* 72: 93-101
- Fujimura, T y Komamine A (1980) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Lett.* 5: 359-367
- Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas UCLV. IBP. Santa Clara
- Gamborg, O, Miller R y Ojaina K (1989) Nutrient requirement suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158
- Gnanapragasam, S y Vasil I (1990) Plant regeneration from a cryopreserved embriogenic cell suspension of a comercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp). *Plant Cell Reports.* 9: 419-423

- Gómez, R (1998) Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. pp. 57-77. IBP, Santa Clara
- Gómez, R, de Fera M, Posada LP, Gilliard T, Bernal M, Reyes V, Chávez M y Quiala M (2002) Somatic embryogenesis of the banana Irbid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium scaled-up in bioreactor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 21-26
- Gómez, R, Guilliard T, Barranco L y Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FIHA-18 (AAAB). *INFOMUSA*. 9 (1): 12-16
- Guiderdoni, E (1986a), L'Embryogenese somatique des explants foliaires de canne a sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. Initiation des cultures. *L'Agronomie Tropicale*: 41(1): 50-58
- Guiderdoni, E (1986b) L'Embryogenese somatique des explants foliaires de canne a sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. Etude anatomique de la morphogenése. *L'Agronomie Tropicale*. 41(2): 160-165
- Guiderdoni, E y Demarly Y (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 14: 71-88
- Griga, M (2000) Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 43 (2): 161-165
- Haccius, B (1977) Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74-81
- Hartweek, L, Lazzeri P, Gui D, Collins G y Williams E (1988) Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In vitro Cell Dev. Biol.* 24: 821-829
- Haydu, Z y Vasil I (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue and anthers of *Penisetum purpureum*. *Theoret. Appl. Genet.* 59: 269-273
- Ho, W y Vasil I (1983a) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118: 169-180
- Ho, W y Vasil I (1983b) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Frowth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann Bot.* 51: 719-726
- Holst, G, Mare K, Wiert M, Postman H y Abbestee R (1996) Somatic embryogenesis Method. *Unite States Patent*. Patent number 5,587. 312
- Jackson, W, Wagnespak H, Richard C, Garrison D, Lester W y Amer J (1990) pp. 65-357 Klientek test in Louisiana, 1985/88. *Soc. Sugarcane Tech.* 10-116
- Javier, F, Ballester A y Vieitez A (1992) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell Report* 11: 609-613
- Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Fac. de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara
- Kott, L y Beversdorf W (1990) Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 23: 187-196
- Liu, M (1992) Plant regeneration in cell suspension cultures of sugarcane as affected by activated charcoal, medium composition and tissue source. *The SABRAO International Symposium on the impact of Biological Research on Agricultural Productivity* pp. 195-205 SABRAO
- Liu, M (1993) Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of callus from cultured immature inflorescences of sugarcane. *J. Plant Physiol.* 141: 714-720
- Liu, M y Chen W (1982) Sugarcane breeding by the use of tissue and cell culture techniques. En: *Proceedings Symposium on plant breeding*, pp. 189-199 SABRADAD, Taiwan
- Liu, M y Vasil I (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum*. *Jacq. Theor. Appl. Genet.* 59: 275-280
- Lourens, AG y Martin FA (1987). Evaluation of *in vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. *Crops Science* (27): 793-796
- Lukse, E, Dinkova T y Ramos M (1996) Aspectos bioquímicos y moleculares de la embriogénesis somática en plantas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 27 (1-2-3): 13-17
- Matsuok, M, Teraychi T, Kobayashi M y Nakano H (1995) Plant regeneration form suspension cultures in sugarcane (*Saccharum* spp). *Plant Tissue Culture Letters* 12 (2): 193-195
- McKersie, B y Browley D (1996) Somatic embryogenesis and artificial seed in forage legumes. *Seed Science Research* 6: 109-126
- Merkle, S, Parrott W y Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed) *In vitro Embryogenesis in Plant*. pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands
- Murashige, T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Nadar, H, Soeprapto S, Heinz D y Ladd S (1978) Fine structure of sugarcane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. *Crop. Sci.* 18: 210-216
- Nomura, K y Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: Torpe TA (Ed). *In vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 249-265. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Parrott, W (1993) Cell culture the Biotechnology applications for banana and plantain improvement. En: *Proceeding of the workshop on byotecnology applications for banana and plantain improment*, pp. 183-191. Reunión INBAP. 1992 San Jose, Costa Rica
- Parrott, W, Dryden G, Vogt S, Hildebrand D, Collins G y Williams E (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 817-820
- Pérez, J (1987) Die nutzung der *in vitro* kultur und die induction von mutationen bei de zuchtung von zuckerrohr (*Saccharum* sp.). Tesis Dr.Habil Universidad de Leipzig
- Pérez, J (1989) Die Nutzung der *in vitro* Kultur und die Induktion von Mutationen bei der Zuchtung von Zuckerrohr (*Saccharum* spp.) Leipzig, Univ. Institut fur tropische Landwirtschaft. Disertación para el grado de Doctor B. Alemania
- Pérez, J (1998) Variación somaclonal. En: JN Pérez Ponce (Ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp 105-121. IBP, Santa Clara
- Pérez, J, Orellana P, Gómez R, Jiménez E y Martín D (1996) Obtención de somaclones mejorados de las variedades de caña (*Saccharum* spp. híbrido) POJ 2878 y C 87-51. En:

- Resúmenes del tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas
- Pérez, J y Rodríguez C (1987). Producción de semillas y propágulos. Apuntes para un libro de texto. Fac. Ciencias Agrícolas. UCLV. Santa Clara
- Perrin, M, Martin D, Joly D, Demangeat G, This P, Masson JE (2001) Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Sci.* 161: 107-116
- Polito, V, McGranahan G, Pinney K y Leslie C (1989) Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Junglans regia* L.) Implications for *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 8: 219-228
- Puigderrajols, P, Mir G y Molinas M (2001) Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). *Annals of Botany* 87 (2). 179-189
- Reinert, J (1958) Untersuchungen über die morphogenese in gewebeulturen. *Ver. Dtsch. Bot. Ges.* 71: 15-24
- Rodríguez – Otubo, B, Pentiado M y do Valle C (2000) Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria* spp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 61: 175-182
- Sánchez, M, Escalona M, Castillo R, Puentes C y Iglesias A (1997) Nuevos elementos de la regeneración de plantas en callos embriogénicos de caña de azúcar. BIOVEG 97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. Ciego de Avila, Cuba
- Sannasgala, K (1989) *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa*. PhD. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholieke Universiteit Leuven
- Sato, S, Newel C, Kolacz K, Tredo L, Finer J y Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports* 12: 408-413
- Schoof, H, Panis B, Strosse H, Mayo A, López J, Roux N, Dolezel J y Swennen R (1999) Cuellos de botella en la regeneración y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de bananos y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellos. *INFOMUSA* 8 (2): 3-7
- Senaratna, T, McKersie B y Bowler S (1990) Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 16: 85-93
- Sharp, W, Evans D, Ammirato P y Yamada Y (1984) Principles and Applications. *Plant Cell and Tissue Culture*, pp. 892-898 Ohio State University press
- Shigeta, J, Sato K y Mii M (1996) Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science* 115: 109-114
- Sondahl, M, Nakamura T y Sharp W (1991) Propagación *in vitro* del café. En: Roca, W. y Mooginski Li (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. pp. 621-642. CIAT. Cali
- Srinivasan, C y Vasil I (1986) Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Pl. Physiol.* 126: 41-48
- Steward, F, Mapes M y Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany.* 45: 705-708
- Street, H y Withers L (1974) The anatomy of embryogenesis in culture. En *Tissue Culture and Plant Science*, pp. 179-187 Academic Press, London. New York
- Stuart, D y Strickland S (1984) Embryogenesis from cell culture of *Medicago sativa*. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters* 34: 74-82
- Taylor, P, Ko H, Adkins S, Rathus C y Birch R (1992) Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28: 69-78
- Timmers, A, Reiss H, Bohsung J, Traxel K y Schel J (1996) Localization of calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *Protoplasma.* 190: 107-118
- Tisserat, B, Esan E y Murashige T (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 1-78
- Vasil, I (1987) Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology* 128: 193-218
- Vasil, I (1988) Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology.* 6: 397-402
- Vasil, K y Vasil I (1982) Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, Gramineae). *American Journal of Botany* 69: 1441-1449
- Vasil, K y Vasil I (1984) Isolation and culture of embryogenic protoplasts of cereals and grasses. *Cell culture and somatic cell genetics of plants, Laboratory procedures and their applications*, Vol. I. pp. 398-403 En: IK Vasil, (Ed). Academic Press, New York.1.
- Vázquez, B y Torres G (1981) Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana
- Wilson, G (1980) Continuous culture of plant cells using the chemostat principle: En: Frechter A (Ed). *Advances in Biochemical Engineering*. Vol.16: pp. 148-156 Springer-Verlag Berlín
- Williams, E y Maheswaran M (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462
- Yeung, E, Rahman H y Thorpe T (1996) Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv Topas. I. Histodifferentiation *Int. J. Plant Sci.* 157(1): 27-39