

## Influencia de diferentes factores sobre la germinación de embriones somáticos encapsulados de *Saccharum spp* híbrido var Cuba 87-51

Elisa Quiala\*, Elio Jiménez, Manuel de Fera, Maité Chávez, Nayvi Pérez, Alina Capote y Raúl Barbón. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: quiala@uclv.edu.cu

### RESUMEN

Se estudiaron diferentes factores con el objetivo de establecer un procedimiento de encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar en gel de alginato de sodio que permitiera lograr la regeneración de plantas *in vitro*. Se determinó que la adición de agua de coco (180 ml.l<sup>-1</sup>) y de los reguladores del crecimiento ácido giberélico (0.5 mg.l<sup>-1</sup>) y 6-Bencilaminopurina (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) al endospermo sintético permitieron incrementar la germinación de los embriones somáticos encapsulados y reducir el tiempo de germinación (de tres a dos semanas). Se comprobó además que la inmersión de las cápsulas en 50 mM de KNO<sub>3</sub> durante cinco horas mejoró la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

**ABREVIATURAS:** AG<sub>3</sub>- Acido Giberélico; 6-BAP- 6-Bencilaminopurina; MS- Murashige y Skoog (1962); ESD- Embrión Somático Desnudo; TESE- Testigo Embrión Somático Encapsulado

Palabras clave: alginato de sodio, caña de azúcar, semilla sintética

### ABSTRACT

With the objective to regenerate plants from sugarcane somatic embryos encapsulated in sodium alginate hidrogel different factors was studied. The addition of coconut water, GA<sub>3</sub> (0.5 mg.l<sup>-1</sup>) and 6-BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) to the synthetic endosperm increased the velocity and germination percentage of somatic embryos encapsulated. The immersion treatment in 50mM solution of KNO<sub>3</sub> during five hours improved the encapsulated somatic embryos germination percentage.

**ABBREVIATOR:** AG<sub>3</sub>- Giberelic Acid; 6-BAP- 6-Bencilaminopurine; MS- Murashige and Skoog (1962)

Key Words: sodium alginate, sugar cane, synthetic seed

### INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática es considerada como el sistema de mayor eficiencia para la propagación masiva, la cual, unida a la encapsulación de los embriones somáticos debe convertirse en una alternativa efectiva para la producción de semillas sintéticas, ya que se podrían producir grandes volúmenes de individuos en cortos períodos de tiempo con costos de producción reducidos (Shigeta, 1995).

La aplicación práctica de una tecnología basada en el empleo de semillas sintéticas requiere del desarrollo de protocolos de encapsulación que preserven la viabilidad y capacidad de germinación de los embriones y que garanticen la protección de las semillas contra daños mecánicos, plagas y enfermedades (Jiménez y Quiala, 1998).

Los embriones somáticos al ser encapsulados logran alcanzar altos porcentajes de germinación (72%) a las tres semanas de cultivo (Quiala *et al.*, 1997), si estos pudieran germinar en menor tiempo, las posibilidades de supervivencia y conversión en

plantas en condiciones de aclimatización serían mayores, ya que los nutrientes de la cápsula pueden ser aprovechados rápidamente por el embrión antes de ocurra el lixiviado de los nutrientes producido por el riego.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente señalados fue objetivo fundamental de este trabajo estudiar una serie de factores que posibilitaran alcanzar altos porcentajes de germinación en un menor período de tiempo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Obtención de embriones somáticos

Se seleccionaron plantas en campo de la variedad Cuba 87-51 con tres meses de cultivo y sintomatológicamente sanas. A las muestras se les eliminaron las hojas más maduras que envuelven el ápice y posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3.0% (v/v) durante 12 minutos. En condiciones asépticas se eliminaron las hojas arrolladas hasta llegar a las hojas más jóvenes que envuelven el meristemo apical, las mismas fueron fraccionadas en pequeños discos, con

un diámetro de 3.0 – 5.0 mm, que contenían las hojas A y B según la clasificación de Guiderdoni y Demarly (1988). Se tomaron los primeros diez discos desde la base del meristemo hacia arriba y se sembraron en el medio de cultivo Payán *et al.* (1977) modificado con 3.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y gelificado con 7.0 g.l<sup>-1</sup> de agar, en el cual permanecieron durante 21 días. Se realizaron dos multiplicaciones sucesivas de los callos con una frecuencia de subcultivo de tres semanas, en el medio de cultivo propuesto por Heinz y Mee (1969) modificado con 3.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D. Los callos fueron transferidos al medio de cultivo de inducción de embriones compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962) modificado con 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 50.0 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco, 100 mg.l<sup>-1</sup> de mioinositol, 8.0 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa gelificado con 9.0 g.l<sup>-1</sup> de agar durante 21 días. Las etapas de formación, multiplicación de los callos e inducción de los embriones somáticos se desarrollaron en condiciones de oscuridad y 28 ± 2.0°C de temperatura. Para la germinación de los embriones somáticos, los callos con estructuras embriogénicas fueron colocados en el medio de cultivo propuesto por Payán *et al.* (1977) libre de reguladores del crecimiento y se incubaron durante siete días en cámaras de crecimiento de luz solar a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) que osciló entre 100 y 125 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> y 28 ± 2.0°C de temperatura. Transcurrido este tiempo los embriones somáticos fueron separados de los callos y utilizados para los experimentos de encapsulación.

### Procedimiento de encapsulación

Los embriones somáticos fueron extraídos de los callos en una cabina de flujo laminar con ayuda de pinzas, bisturíes y un microscopio estereoscópico (OLYMPUS) y colocados en una mezcla de 2.0% de alginato de sodio (Fluka Chemie) y medio de cultivo de germinación, el cual estuvo compuesto por sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.l<sup>-1</sup> de mioinositol, 100 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco, 2.0 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa. Con ayuda de una micropipeta automática (PIPETTBOY) y una pipeta graduada de 10 ml de capacidad seccionada en su extremo inferior, se dejó caer gota a gota 0.5 ml de esta mezcla sobre una solución 110 mM de CaCl<sub>2</sub>, asegurando que en cada gota hubiese un embrión, el tiempo de acomplejamiento fue de 15 minutos. Las cápsulas que se formaron fueron enjuagadas con agua desionizada y distribuidas en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, utilizando como soporte papel de filtro humedecido con agua desionizada estéril. Los frascos con embriones somáticos encapsulados fueron incubados en cámaras de crecimiento bajo las mismas condiciones que durante la germinación de los embriones somáticos.

### Evaluación y procesamiento estadístico de los datos

En todos los experimentos se tomó como principal criterio de evaluación la germinación de los embriones somáticos, considerada como el número de embriones somáticos desnudos o encapsulados capaces de emitir hojas y/o raíces bajo condiciones *in vitro*. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete SPSS para Windows versión 8.0 y se aplicaron pruebas de análisis de varianza simple y bifactorial, mientras que las diferencias entre las medias estadísticas se procesaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

### Efecto de la concentración del agua de coco en la germinación de embriones somáticos encapsulados

Se adicionaron diferentes concentraciones de agua de coco (0, 100, 120, 140, 160 y 180 ml.l<sup>-1</sup>) al endospermo sintético. Se emplearon seis frascos con cinco embriones somáticos encapsulados como réplicas por cada tratamiento y una variante control con cinco embriones somáticos desnudos colocados, que contenía medio de cultivo sólido. A las tres semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos germinados por frasco.

### Influencia del AG<sub>3</sub> sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados

El objetivo de este experimento fue disminuir el tiempo de germinación de los embriones somáticos encapsulados a través de la adición de reguladores del crecimiento, para ello se estudió el efecto de cinco concentraciones de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>), las cuales fueron añadidas al medio de germinación compuesto por sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg de mioinositol, 180 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco y 2.0 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa. Se colocaron cinco embriones encapsulados por frasco de cultivo y diez frascos por tratamiento. Al igual que en los experimentos anteriores se incluyó un control con embriones desnudos sobre medio de cultivo de germinación sólido. A la segunda y tercera semana de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos germinados por tratamiento.

### Influencia de la combinación del AG<sub>3</sub> y el 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados

Se analizó el efecto de cuatro concentraciones de AG<sub>3</sub> (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>) combinadas con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP, adicionadas al endospermo sintético con el objetivo de aumentar la calidad fisiológica de las plantas obtenidas y mantener altos porcentajes de germinación en la segunda semana de cultivo. El medio de cultivo de germinación fue de igual composición que el experimento anterior. Se

colocaron cinco embriones encapsulados por frasco de cultivo y diez frascos por tratamiento como número de réplica. Se incluyó un control con embriones desnudos sobre medio de cultivo de germinación con igual número de réplicas que los embriones encapsulados. Durante la primera, segunda y tercera semana de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos germinados por tratamiento.

**Influencia de la inmersión de las cápsulas en KNO<sub>3</sub> sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados**

El objetivo de este experimento fue disminuir la rigidez de la cápsula e incrementar los porcentajes de germinación de los embriones somáticos encapsulados a través de inmersión de la cápsula en una solución 50 mM de KNO<sub>3</sub>. El endospermo sintético contenía las sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg de mioinositol, 180 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco, 2.0 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP. Se estudiaron varios tiempos de inmersión: una, dos, tres, cuatro y cinco horas. Se colocaron cinco embriones somáticos encapsulados por frasco de cultivo y se emplearon diez frascos por tratamiento como réplica. Se incluyó además un control con embriones desnudos en medio de cultivo sólido de igual composición que el endospermo sintético y con igual número de réplicas que en los tratamientos con embriones encapsulados. Durante la primera, segunda y tercera semana de cultivo se evaluó el

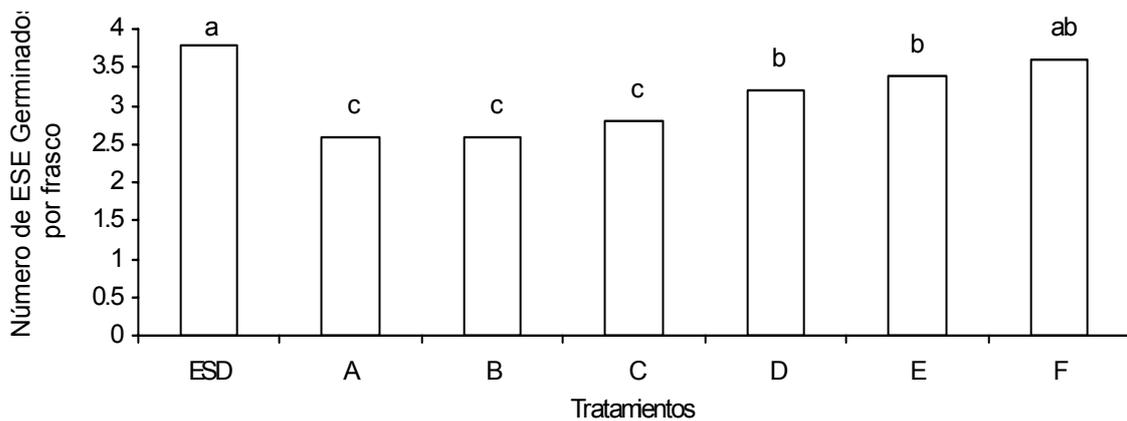
número de embriones somáticos germinados por tratamiento.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Efecto de la concentración de agua de coco en la germinación de embriones somáticos encapsulados**

Cuando se añadió agua de coco al endospermo sintético en concentraciones de 140, 160 y 180 ml.l<sup>-1</sup> se estimuló progresivamente la germinación de los embriones. El número de embriones germinados fue mayor en estos tratamientos con respecto a los embriones encapsulados sin agua de coco (Figura 1). El mayor número de ESE germinados (3.6/frasco) se alcanzó cuando se empleó 180 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco, esto representó un 72% de germinación, valor que fue superior a los obtenidos en los demás tratamientos con embriones somáticos encapsulados y similar al porcentaje de germinación de los embriones somáticos en el tratamiento control con embriones desnudos (76%).

El agua de coco es un componente natural el cual además de su comprobado contenido de reguladores del crecimiento es rico en componentes nutritivos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos y otros elementos nitrogenados (Krikorian, 1993), estos compuestos, a determinadas concentraciones, pueden constituir un aporte esencial en el endospermo sintético de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar.



- ESE:** Embriones Somáticos Desnudos
- A:** Embriones encapsulados sin agua de coco
- B:** 100 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco
- C:** 120 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco
- D:** 140 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco
- E:** 160 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco
- F:** 180 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco

MG ± EE | 3.76 ± 0.12

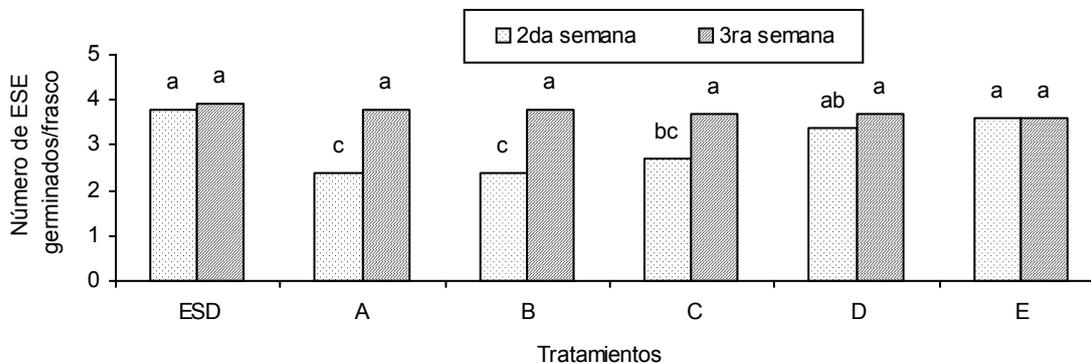
\*Letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente para p<0.05 según el test de Duncan.

Figura 1. Efecto de la concentración del agua de coco en el endospermo sintético, sobre la germinación *in vitro* de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido var. Cuba 87-51) a las tres semanas de cultivo.

### Influencia del AG<sub>3</sub> sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados

La presencia del AG<sub>3</sub> en el endospermo sintético disminuyó el tiempo de germinación de los embriones encapsulados. Al comparar la germinación durante la primera, segunda y tercera semana de cultivo se pudo observar, que esta fue

nula durante la primera semana. Los embriones comenzaron a germinar a partir de la segunda semana, durante la cual se logró obtener valores de germinación de 3.4 y 3.6 ES germinados por frasco en los tratamientos con 1.5 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>, que representó un 68 y 72% de germinación respectivamente, los cuales fueron superiores al control sin reguladores del crecimiento.



**ESE:** Embriones Somáticos Desnudos  
**A:** Embriones encapsulados sin AG<sub>3</sub>  
**B:** 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>  
**C:** 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>  
**D:** 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>  
**E:** 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>

2da semana	MG ± EE	3.0 ± 0.30
3ra semana	MG ± EE	3.7 ± 0.23

\*Letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según el test de Duncan.

Figura 2. Efecto de la concentración de AG<sub>3</sub> sobre la germinación de embriones encapsulados de *Saccharum spp.* híbrido var. Cuba 87-51, durante la segunda y tercera semanas de cultivo.

Durante la tercera semana de cultivo no existieron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. No obstante se debe destacar la presencia de fenoles y etiolación de las plantas en los tratamientos con 1.5 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>, lo cual no se observó en el control sin regulador del crecimiento, ni en los tratamientos con 0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>.

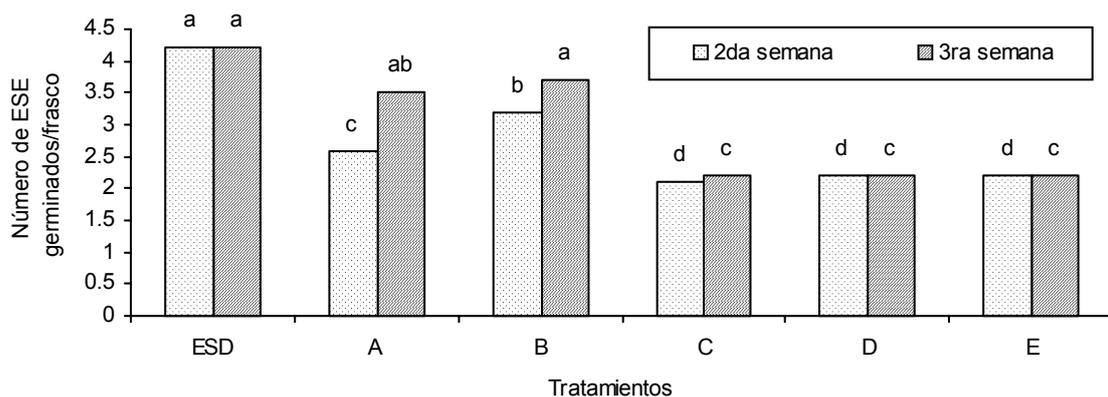
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante la primera y segunda semana de cultivo, podemos señalar, que la adición del AG<sub>3</sub> fue beneficiosa ya que permitió disminuir el tiempo de germinación de los embriones somáticos encapsulados. Varios autores señalan que la adición de AG<sub>3</sub> al endospermo sintético de embriones somáticos de *Saccharum spp* híbrido var Canal Point 53 67 (Tapia *et al.*, 1998), *Camelia japonica* (Janeiro *et al.*, 1997) y *Citrus reticulata* Blanco (Antonietta *et al.*, 1999) incrementó la germinación de los embriones encapsulados en estas especies.

### Influencia de la combinación del AG<sub>3</sub> y el 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados

Con la adición de 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> al endospermo se lograron obtener durante la segunda semana de cultivo, valores de germinación de 3.2 ES/frasco (64%) superiores al número de embriones somáticos germinados por frasco en el

tratamiento control sin reguladores del crecimiento, el cual fue de 2.6 ES germinados por frasco (Figura 3), lo que representó un 52% de germinación. Se debe señalar que las plantas obtenidas presentaron mejores características fisiológicas, las mismas no mostraron síntomas de etiolación (Figura 4). Los valores de germinación durante la tercera semana de cultivo se comportaron similares en todos los tratamientos. La combinación de concentraciones de AG<sub>3</sub> superiores a 0.5 mg.l<sup>-1</sup> con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP fueron en detrimento de la germinación de los embriones encapsulados, obteniéndose plantas etioladas y cápsulas con presencia de fenoles, comportamiento que se mantuvo igual durante la tercera semana de cultivo. Estos resultados pudieron estar provocados por un efecto sinérgico del 6-BAP y el AG<sub>3</sub>. El 6-BAP aplicado a discos de hojas etioladas de *Sorghum halepense* L., fue capaz de estimular el alargamiento de células, cuyo efecto no se pudo lograr con auxinas, la citoquinina al parecer, impidió la desaparición de la giberelina (Barcelló *et al.*, 1995).

Según Kamada (1989) y Sanada *et al.* (1993), el endospermo artificial es el encargado de proteger y nutrir al embrión hasta que este germine y sea capaz de vivir de forma independiente, por lo cual este puede contener nutrientes, sustancias reguladoras del crecimiento, herbicidas, biofertilizantes, agentes protectores contra microorganismos contaminantes, etc.



**ESD:** Embriones Somáticos Desnudos

**A:** Embriones encapsulados sin  $AG_3$  y sin 6-BAP

**B:**  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $AG_3$  +  $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-BAP

**C:**  $1.0 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $AG_3$  +  $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-E

**D:**  $1.5 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $AG_3$  +  $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-E

**E:**  $2.0 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $AG_3$  +  $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-B

2da semana	MG $\pm$ EE	$2.7 \pm 0.1$
3ra semana	MG $\pm$ EE	$3.0 \pm 0.3$

\*Letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según el test de Duncan.

Figura 3. Efecto de la combinación de distintas concentraciones de  $AG_3$  y 6-BAP ( $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) sobre la germinación de embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido var. Cuba 87-51) durante la segunda y tercera semanas de cultivo.

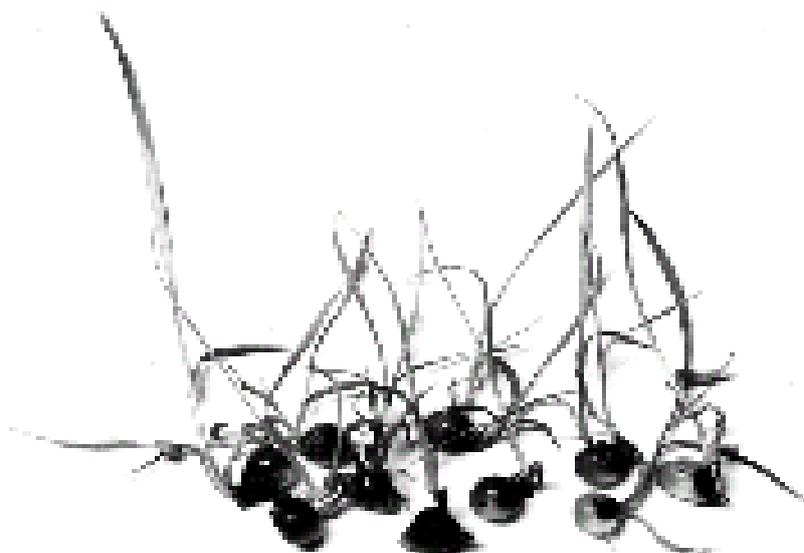


Figura 4. Plantas obtenidas a partir de embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar. (dos semanas de cultivo).

### Influencia del tiempo de inmersión de las cápsulas en $KNO_3$ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados

A través de inmersión de las cápsulas en una solución de  $KNO_3$  se logró disminuir la rigidez del gel y aumentar los valores de germinación hasta 4.0 ES/frasco (80%). Según los resultados obtenidos la inmersión de las cápsulas durante una, dos, tres y cuatro horas no influyó sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados, obteniéndose

diferencias con respecto al tratamiento sin inmersión en  $KNO_3$  solo cuando estas fueron inmersas durante cinco horas, con valores de germinación similares a los embriones somáticos desnudos (4.2 ES/frasco) para 84% (Tabla 1).

Según Sakamoto *et al.*, (1995) este tratamiento ha sido empleado de manera efectiva en cápsulas con embriones somáticos de zanahoria, las cuales fueron inmersas en una solución 200 mM de  $KNO_3$  durante una hora. Estos autores señalan que durante la

inmersión de las cápsulas de alginato de calcio en  $\text{KNO}_3$ , el ión  $\text{Ca}^{2+}$  es sustituido parcialmente por el

$\text{K}^+$  formando enlaces iónicos débiles, lo cual hace el enrejado más frágil y propenso a la ruptura.

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en  $\text{KNO}_3$  de las cápsulas de alginato de sodio sobre el porcentaje de germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar a las dos semanas de cultivo.

Tiempo de inmersión en $\text{KNO}_3$ (horas).	Número de embriones somáticos encapsulados germinados por frasco	Porcentaje de germinación.
1	2.8 c	56
2	2.8 c	56
3	2.8 c	56
4	3.0 bc	60
5	4.0 ab	80
Embriones desnudos.	4.2 a	84
TESE (sin sumergir).	2.6 c	52
	MG±EE	3.5±0.37

\*Letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según el test de Duncan.

## CONCLUSIONES

La germinación de los embriones somáticos de caña de azúcar estuvo determinada por la influencia de diferentes factores tales como la adición de reguladores del crecimiento y suplementos orgánicos como el agua de coco a determinada concentración, así como la aplicación de tratamientos como la inmersión de las cápsulas en una solución rica en potasio, con lo cual se elevaron los porcentajes de germinación.

## REFERENCIAS

Antonietta, GM, Piccioni E y Alvaro S (1999) Effects of encapsulation on (*Citrus reticulata* Blanco) somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 235 – 237

Barcelló, J, Barcelló J, Rodrigo NG, Sabater B y Sánchez R (1995) Mecanismo de acción hormonal. En: Rodrigo, N. G., Sabater, B., Sánchez, R (Eds) *Fisiología Vegetal*. pp. 375 – 402. Barcelló. Ediciones Pirámides, Madrid

Guiderdoni, E y Demarly Y (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 71 – 88

Heinz, DJ y Mee, GWP (1969) Plant differentiation from callus tissue of (*Saccharum*) species. *Crop Sci.* 9: 346-348

Janeiro, VL, Ballester A y Vieitez M (1997) *In vitro* response of encapsulated somatic embryos of camelia. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 51: 119 – 125

Jiménez, E y Quiala E (1998) Semilla Artificial. En: Pérez PJN (Ed) *Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología*. pp. 225 – 240. IBP, Santa Clara

Krikorian, DA (1993) Medios de cultivo, generalidades, composición y preparación. En: Mroginski, M y W, Roca (Eds) *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentación y Aplicaciones*, pp. 41 – 77. CIAT. Cali

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473 – 497

Payán, A, Carmen H y Tascón G (1977) Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) mediante el cultivo de tejidos y yemas. *Acta Agronómica* 37: 43 – 79

Quiala, E, Jiménez E, de Feria M, Barbón R, Chávez M y Capote A (1997) Encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum sp.*). *Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas*. BIOVEG 97. Libro de Resúmenes. Ciego de Ávila, Cuba

Sakamoto, Y, Noboru O y Hirotsawa T (1995) Delivery systems for tissue culture by encapsulation. En: Christie YA, Kozai T, Smith MAL (Eds). *Automation and environmental control in plant tissue culture* pp. 215 – 243. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht

Sanada, M, Sakamoto Y, Hayashi M, Mashiko T, Okamoto A y Onishi N (1993) Celery and Lettuce. En: Redenbaugh, K. (Ed). *Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement*, pp 305 - 328. CRC Press

Shigeta, J (1995) Germination and growth of encapsulated somatic embryos of carrot for mass propagation. *Biotechnology Techniques* 9 (10): 771 – 77

Tapia, R, Nieves N, Blanco MA, Castillo R y González A (1998) Determinación de la capacidad de difusión de la matriz de alginato de sodio para la encapsulación de embriones somáticos de (*Saccharum spp* Hybrid var CP 52-43). Libro de Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO'98 p. 28