

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Instituto de Biotecnología de Las Plantas

**Tesis para optar por el grado científico de *Master*
Science en Biotecnología Vegetal**

Título

**Encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar
(*Saccharum spp.* Híbrido).**

Autor: Ing. Elisa Quiala Mendoza

Tutor: Dr. Elio Jiménez González

Consultante: Reynaldo Quiñones

Junio 2000

Dedicatoria

*A mi madre y a mi esposo por ser
partes indisolubles de mi vida.*

Agradecimientos

Quisiera agradecer:

- *Armando González Rodríguez por su amor y apoyo incondicional.*
- *A mis más que compañeros de trabajo (amigos, sin importar el orden en que se mencionan) Alina Capote, Nayvi Pérez, Raúl Barbón, Maité Chávez, Manuel de Feria por su valiosa ayuda, espiritual y material .*
- *A mi tutor Elio Jiménez por sus sabios consejos y recomendaciones.*
- *A Rafael Gómez Kosky por la ayuda brindada durante la revisión de este manuscrito.*
- *A Idalia Herrera y Marisol Freire a quienes debo el haberme enseñado los conocimientos básicos necesarios que sirvieron de base para la realización de este trabajo.*
- *A Reinaldo Quiñones por su asesoría en el procesamiento y análisis estadístico de los datos experimentales.*
- *A Tony por su gran ayuda durante la impresión del documento.*
- *A Daymí Ramírez, Daniel Agramonte, Miguel Suárez, Yelenys Alvarado, Robin Triana, Felipe Jiménez, Haideé Montesino, Nilo Bucarano, Olguita.*
- *En fin a todos los que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo.*

¡Muchas Gracias!

Resumen

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 germinación en condiciones *in vitro* y la conversión en plantas en fase de aclimatización, así como evaluar el comportamiento en campo de las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos encapsulados. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó inicialmente la concentración de 3.0% de alginato con 15 minutos de reacción en CaCl_2 como la más adecuada para la encapsulación de los embriones somáticos. Se determinó que la adición de agua de coco (180 mL.L^{-1}) y de los reguladores del crecimiento AG_3 (0.5 mg.L^{-1}) y 6-BAP (0.2 mg.L^{-1}) al endospermo sintético permitió incrementar la germinación *in vitro* de los embriones encapsulados y reducir el tiempo de germinación (de tres a dos semanas). La inmersión de las cápsulas en 50 mM de KNO_3 disuelto en medio de cultivo (igual composición que el medio de encapsulación) durante cinco horas mejoró la germinación de los embriones somáticos encapsulados. Se comprobó que el Vitrofurax (30 mg.L^{-1}) puede ser empleado en la esterilización química del endospermo sintético de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar, lo cual permitió reducir la concentración de alginato de sodio de 3.0 a 2.0% y realizar todas las operaciones en condiciones no estériles. Se definió un protocolo para la encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar y se logró la conversión de embriones somáticos encapsulados en condiciones de área de aclimatización. Las plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados mostraron en condiciones de campo características similares a las plantas propagadas vía yemas axilares, mayor número de tallos y reducción en el diámetro, sin diferencias en el contenido de brix con respecto a las plantas de estacas, el número de tallos fue mayor en las plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados que en las plantas micropropagadas.

Indice

| Indice | Pág |
|--|-----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Revisión bibliográfica..... | 3 |
| 3. Materiales y Métodos. | 27 |
| 3.1. Estudio de la composición del endospermo sintético. | 30 |
| 3.1.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción en CaCl ₂ sobre la germinación de los embriones somáticos..... | 30 |
| 3.1.2. Efecto de la concentración del agua de coco en el endospermo sintético sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados..... | 31 |
| 3.1.3. Influencia del AG ₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados..... | 32 |
| 3.1.4. Influencia del AG ₃ y el 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados. | 32 |
| 3.2. Protección química de la cápsula. | 33 |
| 3.2.1. Influencia del Vitrofurax sobre la germinación de los embriones somáticos desnudos. | 33 |
| 3.2.2. Influencia del Vitrofurax sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados. | 34 |
| 3.3. Influencia de la inmersión de las cápsulas en KNO ₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados. | 35 |
| 3.3.1. Estudio de diferentes tiempos de inmersión en KNO ₃ | 35 |
| 3.3.2. Influencia de la forma de aplicación del KNO ₃ | 35 |
| 3.4. Plantación de los embriones somáticos encapsulados en área de aclimatización..... | 37 |
| 3.5. Evaluación en campo de plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados..... | 38 |
| 4. Resultados y Discusión. | 40 |
| 4.1. Estudio de la composición del endospermo sintético..... | 40 |
| 4.1.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción en CaCl ₂ sobre la germinación de los embriones somáticos. | 40 |
| 4.1.2. Efecto de la concentración de agua de coco en el endospermo sintético sobre los embriones somáticos encapsulados. | 42 |



| | |
|---|----|
| 4.1.3. Influencia del AG ₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados. | 43 |
| 4.1.4. Influencia del AG ₃ y el 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados..... | 46 |
| 4.2. Protección química de la cápsula... .. | 49 |
| 4.2.1. Influencia del Vitrofurax sobre la germinación de los embriones somáticos desnudos..... | 49 |
| 4.2.1. Influencia del Vitrofurax sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados..... | 51 |
| 4.3. Influencia de la inmersión de las cápsulas en KNO ₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados..... | 53 |
| 4.3.1. Estudio de diferentes tiempos de inmersión en KNO ₃ | 53 |
| 4.3.2. Efecto de la forma de aplicación del KNO ₃ | 55 |
| 4.4. Plantación de los embriones somáticos encapsulados en condiciones de área de aclimatización..... | 57 |
| 4.5. Evaluación en campo de plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados..... | 61 |
| 5. Conclusiones..... | 64 |
| 6. Recomendaciones..... | 65 |
| 7. Bibliografía..... | 66 |



Revisión Bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica.

2.0. Ubicación taxonómica y origen de la caña de azúcar.

Según Cronquist (1988) desde el punto de vista de la ubicación taxonómica, la caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido) se encuentra ubicada dentro de la:

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidas

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Saccharum*.

La caña de azúcar (*Saccharum spp. Híbrido*), como planta cultivada se originó en Nueva Guinea (Grassl, 1974) y en su proceso evolutivo representó un papel importante la introgresión entre *Ripidium*, *Sclerostachya* y *Miscanthus*, con un alto nivel de variación de ploidía, lo que dio como resultado un grupo de especies y variedades interespecíficas que componen el género *Saccharum* y también a las variedades intergenéricas con géneros próximos. Es por tanta vastedad sistemática y cuantitativa que a este grupo se le denomina "complejo *Saccharum*". *S. spontaneum*, la más variable en su número de cromosomas ($2n = 40$ a 128) y sus formas derivaron a *Saccharum robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* y *S. officinarum* L., esta última fue el producto más eficiente de este proceso evolutivo, ya que aporta las mejores características azucareras (Grassl, 1974).

A causa del complejo origen de la caña de azúcar, ésta posee características citogenéticas excepcionales con relación a la mayoría de las plantas; en ella se encuentran fenómenos tales



como poliploidía, aneuploidía, mosaicismo cromosómico, y anomalías en la meiosis, lo que convierte las poblaciones de este cultivo en heterocigóticos complejos (Pérez *et al.* 1997).

Por medio de trabajos de hibridación y selección se han obtenido híbridos de varias especies con muy buenos resultados económicos para cada país cañero, entre ellas figura la *Saccharum spp* Híbrido.

La caña de azúcar es uno de los principales renglones económicos de Cuba por lo que la aplicación de nuevas técnicas que ayuden a elevar los rendimientos económicos y a la disminución de los costos de producción constituyen elementos importantes a tener en cuenta en el desarrollo de este cultivo. Las técnicas biotecnológicas dado por sus grandes ventajas se pueden considerar métodos revolucionarios que ayudan a este desarrollo (Aftab y Iqbal, 1996).

2.1. Embriogénesis somática en caña de azúcar.

La embriogénesis somática ofrece un gran potencial para la obtención a gran escala de semilla. Esto está dado por dos razones fundamentales: en primer lugar, la naturaleza del material regenerado, embriones somáticos, los cuales son estructuras bipolares con meristemos apicales y radicales funcionales que se separan con gran facilidad o que pueden formarse libremente en medios líquidos; en segundo lugar están los métodos masivos que pueden utilizarse para producirlos (Preil y Beck, 1991). El cultivo de embriones en medios líquidos, el empleo de biorreactores para la producción a gran escala y el encapsulado constituyen el reto actual para los propagadores de plantas (Jiménez, 1995).

El proceso de morfogénesis *in vitro* de la embriogénesis somática está descrito para 11 familias de monocotiledóneas herbáceas: Alliaceae, Asparagaceae, Tridaceae, Musaceae, Zingiberaceae, Araceae, Discoreaceae, Hemerocallidaceae, Liliaceae, Orchidaceae y Poaceae (Gramineae) (Krishnaraj y Vasil, 1995).



2.1.1. Explantes.

En la mayoría de las gramíneas la embriogénesis somática y la regeneración de plantas pueden ser obtenidas cultivando tejidos embriogénicos. En el caso de la caña de azúcar, generalmente, se utilizan las hojas jóvenes arrolladas que envuelven al meristemo apical ya sea de plantas cultivadas *in vitro* (Guderdoni y Demarly, 1988; Aftab *et al.*, 1996; Falco *et al.*, 1996b; Freire *et al.*, 1999) o de hojas jóvenes de plantas crecidas en campo o invernaderos (Ho y Vasil, 1983 a; Taylor *et al.*, (1992); Jiménez (1995); Gómez (1996).

Guiderdoni (1986a) puso en evidencia la existencia de un gradiente de callogénesis en dependencia de la posición de la hoja, concluyendo que el callo nodular embriogénico se forma de las hojas más cercanas al meristemo (hojas A y B), sin embargo con anterioridad Ho y Vasil (1983) habían señalado que las hojas más cercanas al meristemo (hojas 1 y 2) producían una menor proporción de callos embriogénicos que las hojas 4 y 5, además de presentar problemas con la oxidación fenólica. No obstante, todos coinciden en la utilización de explantes foliares en estado fisiológico muy joven.

2.1.2. Medios de cultivos.

El 2,4-D ha sido el regulador del crecimiento más empleado en la embriogénesis somática de las gramíneas, por su papel determinante durante el proceso de dediferenciación, inducción del callo y formación de las células embriogénicas (Vasil, 1985), y específicamente en la caña de azúcar se utiliza en dosis que oscilan entre 0.5 - 7 mg.L⁻¹ (Ho y Vasil, 1983; Guiderdoni, 1986 a), no obstante el rango más utilizado está alrededor de los 3 mg.L⁻¹ durante la fase de formación y multiplicación del callo (Pérez, 1989; Jiménez, 1995; Gómez, 1996; Freire, 1999), de 0.5 – 1 mg.L⁻¹ en la fase de inducción de los embriones somáticos y se elimina totalmente para la regeneración de plantas.



Lee (1987) destaca que el 6-BAP es otro de los reguladores del crecimiento empleado en casi todos los medios de micropropagación reportados para el cultivo de la caña de azúcar, en concentraciones que oscilan entre $0.1 - 0.624 \text{ mg.L}^{-1}$, en dependencia de si es empleado solo o combinado con otros reguladores del crecimiento.

Por otro lado las plantas cultivadas *in vitro* son selectivas a la cantidad y a la forma química de los iones presentes en el medio de cultivo. Para la caña de azúcar se recomienda el empleo de las sales Murashige y Skoog (1962) (Gnanapragasan y Vasil, 1990; Taylor *et al.*, 1992; Liu, 1993). Sin embargo, otros proponen el empleo del medio N₆ por la relación $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (Brisibe *et al.*, 1994, Matsuoka *et al.*, 1995).

En la embriogénesis somática de la caña de azúcar también juegan un papel importante los suplementos orgánicos como el agua de coco (Payán *et al.*, 1977) y la sacarosa, esta última se emplea en concentraciones que varían entre un 6 – 8%.

Algunos autores como Heinz y Mee (1969); Pérez, (1989); Jiménez, (1995) y Gómez, (1996) destacan el empleo del agua de coco tanto en la micropropagación de la caña de azúcar como en la formación de callos y la obtención de embriones somáticos. Dix y Van Staden, (1982) y Jiménez, (1995) durante la micropropagación de la caña de azúcar encontraron que el agua de coco tuvo un efecto auxínico, similar al AIA. Sin embargo este componente natural además de su comprobado contenido de reguladores del crecimiento es rico en elementos nutritivos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos y otros elementos nitrogenados (Roca y Wroginski, 1993).

Los medios para la maduración y germinación de los embriones somáticos tienen también disímiles composiciones, aunque es generalizada la eliminación del 2,4-D. Existen algunos muy simples como el empleado por Brisibe *et al.* (1994) que solo utiliza sales MS y 10 % de agua de coco. Otros no son tan simples y contienen incluso mezcla de varios reguladores del



crecimiento por ejemplo Gnanapragasan y Vasil (1990) utilizan en el medio de cultivo sales MS, 3% 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 dosis de zeatina.

2.2. Origen y concepto de semilla sintética.

La importancia del cultivo de tejidos para la propagación clonal en la agricultura continúa incrementándose cada año. Desde la década de los 80 se ha planteado que el potencial de altos volúmenes de producción de embriones somáticos combinado con la formación de semillas sintéticas, por el bajo costo, pueden abrir un nuevo campo en la propagación clonal (Redenbaugh *et al.* 1987 a).

La idea de producir semillas sintéticas surgió a partir de que Murashige (1977) mencionara la posibilidad de regenerar plantas a partir de embriones somáticos recubiertos por un endospermo sintético, esta idea fue llevada a la práctica por vez primera por Kitto y Janick (1982) al obtener semillas sintéticas deshidratadas y por Redenbaugh *et al.* (1984) al lograr semillas sintéticas hidratadas.

Se han manejado varios conceptos de semilla sintética (Fujii *et al* 1987). Sin embargo, el que más se ajusta a las aplicaciones actuales es el que define la semilla sintética como, "... la encapsulación de embriones somáticos, ápices, agregados celulares o cualquier otro tipo de tejido que pudiera ser utilizado para la propagación, que tenga además habilidad para convertirse en plantas completas tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* y que sean capaces de mantener esta potencialidad después del almacenaje..." (Aitken-Chirstie *et al.*, 1995). Esta definición diversifica el concepto de semilla sintética teniendo en cuenta no solo la encapsulación de embriones somáticos y lo vincula además con los términos de almacenaje y producción de plantas.



La encapsulación no solo permitirá la propagación de plantas sino también la conservación de germoplasma (Accart *et al.* 1994; Gardi *et al.* 1999) y la reducción de los costos de producción de los ciclos de micropropagación (Piccioni *et al.* 1996).

La idea de sembrar los embriones encapsulados directamente a nivel de campo utilizando una máquina sembradora, como se hace con la semilla cigótica, podría hacer que los costos durante el trasplante se llegaran a reducir extraordinariamente y hacer más competitivos los precios frente a la semilla cigótica lo cual abriría las puertas a la propagación *in vitro* al mercado de semillas en muchas especies (Redenbaugh *et al.*, 1993).

2.3. Usos potenciales y tipos de semillas sintéticas.

La semilla sintética no se ha logrado llevar aún a escala comercial por varios inconvenientes que limitan su uso práctico (Kozai *et al.* 1991; Carlson y Harttle, 1995).

Según Redenbaugh *et al.*, (1993) la semilla sintética podrá ser aplicada exitosamente en la propagación de plantas, siempre y cuando se tengan en cuenta diferentes consideraciones, tanto económicas, biológicas como tecnológicas necesarias para el desarrollo de este sistema de propagación.

Desde el punto de vista económico seleccionar aquellos cultivos que pueden ser beneficiados con el desarrollo de esta tecnología como es el caso de las plantas de propagación vegetativa (caña de azúcar, boniato, etc), plantas perennes (fundamentalmente especies forestales), híbridos obtenidos por cruzamiento, genotipos los cuales pueden perderse por la vía de la reproducción sexual, plantas obtenidas por ingeniería genética, germoplasmas élites, cultivos en los cuales un solo sexo es el útil (espárrago, kiwi), especies de plantas tropicales y ornamentales que no producen semillas viables y necesitan ser propagadas por estacas (McKersie y Brown, 1996). No obstante desde el punto de vista biológico debemos contar con protocolos que permitan obtener embriones somáticos uniformes y sincrónicos de alta calidad,



capaces de permanecer en dormancia, germinar con alta frecuencia bajo condiciones de asepsia y baja nutrición con una tasa de variación somaclonal controlada y relativamente baja dentro de los límites permisibles.

Existen otras limitantes del orden tecnológico, como son la necesidad de un proceso de escalado que permita un número elevado de embriones somáticos, la implementación de maquinarias que permitan la automatización del proceso, desarrollar métodos de encapsulación que permitan almacenar la semilla manteniendo su viabilidad y capacidad de germinación y que al mismo tiempo garanticen la protección de las semillas contra plagas y enfermedades.

La aplicación práctica de la tecnología de la semilla sintética para la producción en masa de plantas requiere del desarrollo de tecnologías que garanticen la producción de embriones somáticos con un alto porcentaje de conversión en condiciones de fase de aclimatación, un sistema de escalado en biorreactores y una integración de la embriogénesis somática y la encapsulación automatizada (Jiménez y Quiala, 1998).

La semilla sintética puede ser empleada además en la propagación de plantas femeninas o masculinas estériles para la producción de semilla híbrida y en la conservación de germoplasma, particularmente en especies recalcitrantes como mango, cacao, coco donde la semilla natural posee alto contenido de agua (Senaratna y Mckersie, 1990), además la semilla sintética facilita el transporte de grandes volúmenes de propágulo en contenedores reducidos evitando la transportación de grandes volúmenes de plantas, la demora por las medidas cuarentenarias y la diseminación de enfermedades (Senaratna, 1992).

De todos los sistemas de semilla sintética que se han probado los que mayor auge han alcanzado, son los embriones hidratados encapsulados individualmente en gel de alginato y los embriones desecados y recubiertos en polioxietilenglicol respectivamente. Esto obedece en gran parte a las ventajas que ofrece la cápsula en la protección mecánica del embrión, no solo



porque constituye el portador de las sustancias nutritivas y protectoras del embrión, sino que facilita además su manejo y almacenamiento (Senaratna, 1992).

2.3.1. Semillas sintéticas deshidratadas.

Las semillas deshidratadas consisten en la plantación de embriones somáticos desecados sin recubrir (Gray y Conger, 1985), o revestidos con una resina plástica como el polioxietilenglicol (Polyox WSR-N 750) en forma de perlas descrito por Kitto y Janick (1982) en embriones somáticos de zanahoria.

Takahata *et al.*, (1993) plantean que si los embriones somáticos pudieran mantener la viabilidad, después que su contenido de agua haya disminuido a un nivel similar al de la semilla natural, podrían entonces las semillas sintéticas deshidratadas superar el déficit de las semillas sintéticas hidratadas y tener una mayor aplicación en la regeneración y conservación de plantas.

El desarrollo de las técnicas de desecación de embriones, así como el endurecimiento de los embriones somáticos constituye una solución promisoría para la obtención de la semilla sintética deshidratada (Tetteroo, 1996; Timbert *et al.*, 1996). La tolerancia a la desecación se obtiene cada día en mayor número de especies, pero muchos resultados son expresados como la frecuencia de supervivencia, los cuales no son suficientes para medir la capacidad para regenerar plantas normales. Por otro lado los métodos de deshidratación varían, estos pueden consistir en mantener los embriones durante 24 horas a 90% de humedad relativa (Kim y Janick, 1990), o tres horas en silicagel (Lida *et al.*, 1993), o someter los embriones a una deshidratación progresiva en subsiguientes cámaras, las cuales tienen diferentes humedades relativas. Tanto la velocidad de deshidratación como la rehidratación pueden tener una gran importancia para la supervivencia de los embriones (Tetteroo, 1995; Timbert *et al.*, 1996). Generalmente para que el embrión sea capaz de sobrevivir a la desecación se emplean tratamientos con ABA y elementos osmóticos, esto se ha diversificado a diferentes cultivos



como *Vitis longii* 'Microsperma' (pasto) (Gray *et al.*, 1989,); alfalfa (Senaratna *et al.*, 1990; Redenbaugh *et al.* 1993); *Picea glauca* (Moench) Voss (pino blanco) (Attree *et al.*, 1995); *Brassica napus* (L) (remolacha) (Senaratna *et al.*, 1991); *Pelargonium domesticum* (geranio) (Marsolais *et al.*, 1991); zanahoria (Florin *et al.*, 1993, Gray *et al.*, 1995), aunque solo pocos autores como Timbert *et al.* (1996) describen el empleo combinado de embriones somáticos desecados con la encapsulación de los mismos en gel de alginato. Senaratna (1992) plantea que aunque la encapsulación no es indispensable para la germinación de los embriones somáticos, si es ventajoso contar con una semilla sintética desecada recubierta, ya que la cápsula protege al embrión de los daños mecánicos y le brinda una forma adecuada para la mecanización durante la plantación. Por otro lado a la misma se pueden incorporar nutrientes y reguladores del crecimiento, además la cápsula evita que la toma de agua del embrión ocurra de forma drástica, previniendo así los daños por imbibición.

2.3.2. Semillas sintéticas hidratadas.

La semilla sintética hidratada consiste en la encapsulación de un material vegetal determinado el cual es mezclado con un gel como el alginato de sodio y goteadas en una solución de cloruro de calcio, formándose de esta forma la cápsula, las cuales son lavadas y plantadas. Este método fue empleado por primera vez por Redenbaugh *et al.*, (1987) obteniendo de un 60.0 – 90.0% de germinación "*in vitro*" y de un 2.0 – 10.0% de conversión en siembra directa a campo. Aunque este sistema es uno de los más empleados para la semilla sintética tiene como desventaja la necesidad de un material de cubierta y un tiempo de almacenaje muy limitado (Takahata *et al.* 1993).

Diferentes autores refieren porcentajes de germinación obtenidos en embriones y yemas encapsuladas utilizando esta técnica de semilla hidratada, como es el caso de Bapat y Rao, (1988) quienes obtuvieron en yemas encapsuladas de *Santalum album* (L) (sándalo) un 16.0% de germinación y no se logró la conversión de las mismas. Fujii *et al.*, (1989) indican valores de



germinación en semillas sintéticas de alfalfa de un 70.0 a un 90.0% y de un 48.0 a un 64.0% de conversión en condiciones de invernaderos. Vilariño *et al.* (1996) obtuvieron un 98.0% de germinación y 83.4% de conversión en yemas encapsuladas de papa. Quiala, (1995) obtuvo valores de germinación *in vitro* de un 54.0 – 60.0% en embriones somáticos encapsulados de café. Bazinet *et al.*, 1996 describen valores de germinación de un 50% en la encapsulación de embriones somáticos de zanahoria. Maruyama *et al.* (1997) en ápices meristemáticos encapsulados de *Cedrela odorata* (L.), *Guazuma crinita* (Mart) y *Jacaranda mimosaeifolia* (D. Don) informan valores de germinación de 60.0, 80.0 y 100% respectivamente, pero cuando se llevaron a condiciones *in vivo* la conversión se redujo a un 6.7, 3.3 y 31.7% respectivamente; sin embargo, cuando estas fueron incubadas *in vitro* durante una semana los valores de conversión se incrementaron entre un 28.6 y 100%.

2.4. Materiales vegetales más empleados para la encapsulación.

2.4.1. Encapsulación de embriones somáticos.

El embrión somático ha constituido el material vegetal mayormente empleado para la obtención de semillas artificiales, este constituye una unidad bipolar, lo cual permite el desarrollo de brotes y raíces en un mismo medio de cultivo, esta característica lo hace más deseable que cualquier otro material vegetal (yemas, ápices, etc.) (Sakamoto *et al.*, 1995).

Los estudios realizados durante el desarrollo de la semilla artificial han traído consigo que la tecnología se diversifique considerablemente (Redenbaugh *et al.* 1990; Sanada *et al.* 1993), encapsulándose embriones somáticos de cultivos como *Medicago sativa* (alfalfa) (Fujii *et al.* 1989, Shigeta, 1995); *Dendrocalamus strictus* (L). (bambú) (Makunthakumar y mathur, 1992); *Daucus carota* L. (zanahoria) (Molle *et al.* 1993; Onishi *et al.* 1994, Bazinet *et al.*1996, Timber *et al.* 1996,); *Picea abis* (abeto) (Roberts *et al.* 1993); *Apium graveolens* (apio) (Janick *et al.* 1993); *Coffea arabica* (L) (café) (Quiala, 1995); *Eleusine corocana* Gaerth (George y Eapen, 1995); *Eucaliptus citriodora* (eucalipto) (Marlidharan y Mascarenhas, 1995); rábano picante (Repunte *et*



al., 1995; Uozumi y Kobayashi, 1995); *Oryza sativa* (L) (arroz) (Suprasanna *et al.*, 1996); *Camelia japonica* (Janeiro *et al.* 1997); *Carica papaya* (L) (papaya) (Castillo *et al.* 1998); *Cleopatra tangerine* (Nieves *et al.* 1998) *Citrus reticulata* Blanco (Antonietta *et al.* 1999).

2.4.2. Encapsulación de ápices, yemas, meristemos.

La encapsulación de brotes, ápices, yemas y semillas ha constituido una alternativa interesante de propagación en varias especies aunque en contraste con los embriones somáticos, los cuales son unidades bipolares, los ápices y yemas no tienen meristemo radical y deben regenerar raíces para ser capaces de convertirse en plantas completas (Piccioni y Standardi, 1997).

Diversos autores han descrito la inducción de raíces en este tipo de propágulos mediante tratamientos específicos, diversificándose la encapsulación de yemas, meristemos y otros tipos de propágulos a diferentes cultivos como *Morus indica* (L). (mora) (Bapat y Rao, 1990), ápices meristemáticos de *Musa sp* (banano) (Rao *et al.* 1993), yemas de *Lactuca sativa* (L) (lechuga) (Sakamoto *et al.* 1993), yemas de *Saccharum spp Híbrido* (caña de azúcar) (Ramanujam y Ramamoorthy, 1993), ápices meristemáticos de banano (Bapat y Rao, 1993; Matsumoto *et al.*, 1995), yemas axilares de *Solanum tuberosum* (L) (papa) (Vilariño *et al.*, 1996; Agramonte, 1999), yemas de *Actinidia deliciosa* (Liang & Ferguson) (kiwi), *Betula pendula* Roth (melocotón), *Malus spp* (manzano) (Piccioni y Standardi, 1995; Falcinelli *et al.*, 1997; Capuano *et al.*, 1998), *Rubus spp* (yerba mora), *Rubus idaeus* (L) (frambuesa), *Crataegus oxyacantha* (L) (Piccioni y Standardi, 1995), Mora (Pattnaik y Chand, 1996), *Viburnum odoratissimum* (viburnum) (Tang, 1996); *Camelia japonica* (Camelia) (Ballester *et al.* 1997), ápices de especies forestales como *Cedrela odorata* (L), *Guazuma crinita* (Mart), *Jacaranda mimosaeifolia* (D Don) (Maruyama *et al.* 1997), semillas de *Spathoglottis plicata* (orquidea) (Tan *et al.* 1998, Khor *et al.*, 1998); *Actinidia* cv. Hayward (Standardi y Piccioni, 1998) y yemas de *Olea europea* (L) (olivo) (Micheli *et al.* 1998).



2.5. Principales geles empleados en la encapsulación.

Desde que Redenbaugh *et al.* (1984) descubrieron que algunos hidrogeles como el alginato de sodio podían ser utilizados en la elaboración de semillas con embriones individuales hasta la actualidad se han ensayado varios sistemas para la encapsulación, pero de todos ellos solo los métodos basados en la gelación son los que han tenido algún resultado (Tan *et al.* 1998).

El hidrogel de alginato es el que se emplea con mayor frecuencia para formar la matriz de la semilla sintética, pues tiene como rasgo una viscosidad moderada y baja toxicidad, así como una rápida gelificación a temperatura ambiente y sus ventajas están dadas por la no fitotoxicidad, insignificante disminución del poder germinativo de los embriones y la simplicidad del proceso de gelificación que consiste en depositar gota a gota una mezcla de alginato + medio de cultivo + embrión en una solución de CaCl_2 , lo cual facilita la mecanización del proceso de encapsulado. Estas ventajas están asociadas también a varios aspectos negativos como la insuficiente elasticidad del gel, endurecimiento del gel, problemas con el intercambio de gases y pérdida de agua con facilidad (Redenbaugh *et al.* 1987).

Según Redenbaugh *et al.* 1993 el proceso de encapsulación tiene lugar a partir de una reacción de acomplejamiento entre el alginato de sodio y el cloruro de calcio. El alginato de sodio forma complejo cuando se mezcla con cationes de metales di- o trivalentes (Ca^{2+}) para formar alginato de calcio (gel endurecido), formándose de esta manera enlaces iónicos entre el calcio divalente y los grupos carboxílicos del ácido galurónico del alginato de sodio. Las unidades de estos dos ácidos se acoplan y forman el alginato de sodio, estas unidades se distribuyen en bloques, los cuales pueden encontrarse formando bloques homopoliméricos de ácido galurónico, bloques homopoliméricos de ácido manurónico, bloques heteropoliméricos de ácido galurónico y ácido manurónico. La disposición de estos bloques depende del origen del alga marina, la época de cosecha del alga y la parte del alga de la cual se haya extraído el



alginato, siendo el alginato más comercial aquel que se extrae de algunas algas marinas gigantes como *Macrosystis pyrifera* y *Laminaria hiperborea*.

El alginato de sodio rico en ácido galurónico forma cápsulas más duras que el alginato rico en ácido manurónico, mientras mayor sea el contenido de ácido galurónico mejor calidad tendrá el gel que este formará, mayor porosidad, mejor estabilidad entre los iones que forman el enrejado y por tanto mayor fortaleza mecánica.

2.6. Factores que influyen en la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

2.6.1. Calidad del embrión

La calidad del embrión es el factor más importante para la conversión de las semillas sintéticas, por tanto los embriones seleccionados deben tener determinadas características como: desarrollarse sincrónicamente, germinación sincrónica de las raíces y los vástagos, tener una rápida conversión dentro de la cápsula, no formar callos ni embriones secundarios, poseer un alto contenido de proteínas, almidón y lípidos y mantener un genotipo y fenotipo uniforme (Li, 1989).

La producción masiva de embriones somáticos es el principal problema a solucionar para poder establecer un programa de semilla sintética en cualquier especie. Este sistema debe permitir la producción en masa de grandes volúmenes de embriones incluyendo su escalado en biorreactores, deben además desarrollarse los métodos para lograr el desarrollo sincrónico de este proceso de manera tal que la mayor proporción posible de embriones alcance el estado de torpedo al momento de la cosecha e inducir en estos embriones la acumulación de sustancias de reserva que le permitan después lograr altos niveles de conversión en campo (Jiménez y Quiala, 1998).

Con respecto a la sincronización del proceso de embriogénesis han sido descritos varios métodos, los cuales pueden dividirse en dos grupos. En el primer grupo se incluye la



separación física con el empleo de tamices o cribas para clasificar los agregados embriogénicos por tamaño y a partir de aquí lograr un desarrollo uniforme de la suspensión celular o también separar los embriones por estadíos dentro de una mezcla en un biorreactor. El método de tamizado puede ser combinado además con la utilización de centrifugación en gradientes de sacarosa, Percoll o Ficoll, lo cual ha brindado excelentes resultados en la sincronización de suspensiones celulares de zanahoria (Nomura y Komamine, 1995). El método de tamizado constituye una rutina en todo protocolo de regeneración vía embriogénesis a partir de suspensiones celulares, pues siempre los agregados son separados por tamaños en cada subcultivo y se determina la fracción más embriogénica, aún cuando no se logren determinados niveles de sincronización (Jiménez *et al.*, 1995; Komamine, 1998, Takayoshi *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1998).

En un segundo grupo están los métodos basados en la sincronización fisiológica con la utilización del ácido abscísico (ABA) o la manipulación del potencial osmótico del medio de cultivo. El ABA suministrado exógenamente interfiere en las funciones de los reguladores del crecimiento endógenos favoreciendo la embriogénesis, es responsable de la inducción de la dormancia y evita la germinación precoz de los embriones (Gray y Purohit, 1991, Gutmann *et al.*, 1996). A la vez el ABA promueve la maduración, la acumulación de sustancias de reserva y un desarrollo más completo de los embriones. Por tal razón ha sido muy utilizado también para incrementar la calidad de los embriones, fundamentalmente por la acumulación de proteínas y carbohidratos de reserva, mejorando la germinación de los embriones encapsulados (Fujii *et al.*, 1989). La conversión de los embriones somáticos en plantas es uno de los aspectos más importante de la tecnología de la semilla sintética y aún uno de los factores que limita su uso práctico (Kozai *et al.*, 1991; Taurus y Dustan, 1995; Standardi y Piccioni, 1996).

La desecación, como un medio de estabilización y endurecimiento del embrión somático constituyen una opción promisoría en el camino de la semilla sintética (Tetteroo *et al.*, 1995).



2.6.2. Dureza de la cápsula.

Se ha observado frecuentemente que no todos los embriones encapsulados emergen del gel endurecido, aunque la calidad de estos sea excelente. Las posibles causas de esta inhibición en la germinación pueden ser una insuficiente elasticidad o excesivo endurecimiento del gel o también por la falta de oxígeno una vez formada la cápsula (Redenbaugh *et al.*, 1987a). La naturaleza y concentración del alginato de sodio, la concentración del agente acomplejante y el tiempo de duración de la reacción de acomplejamiento son factores que influyen en la dureza de la cápsula. Manejando estos factores se puede conseguir una dureza tal de la cápsula que no inhiba el crecimiento del embrión y a la vez lo proteja de daños mecánicos durante la manipulación, esta dureza debe estar entre los 0.2 y 2.0 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de presión (Redenbaugh *et al.*, 1987a; Shigeta *et al.*, 1990; Redenbaugh *et al.*, 1993).

En varios casos se ha observado que la conversión de los embriones somáticos encapsulados ha sido menor que en los embriones desnudos (Deng *et al.* 1990), lo cual indica que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece un endospermo excesivamente duro, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones.

Redenbaugh *et al.* (1987) plantearon que la dureza adecuada de las cápsulas de alfalfa para que permitan una buena germinación y no sufran fracturas durante su manejo, está entre 0.5 y 2.0 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de presión. Shigeta *et al.* (1990) recomiendan como tiempo de inmersión óptimo de 20 - 30 minutos para propiciar una dureza de las cápsulas de 0.5 – 2.0 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ lo cual permite una buena manipulación de las mismas. Molle *et al.* (1993) encapsularon embriones de zanahoria empleando una solución de cloruro de calcio de 7.35 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un tiempo de inmersión de 30 minutos. Bapat (1993) destaca la encapsulación de yemas de mora empleando una concentración de cloruro de calcio de 1.06 $\text{g}\cdot 150\text{ mL}$ y un tiempo de inmersión de 30 minutos. Agramonte, 1999 en yemas de papa encapsuladas refiere como cuando se aumentaron los



tiempos de reacción por encima de 20 minutos en una solución de un 1.0 g.L^{-1} de CaCl_2 , se manifestó una disminución de los porcentajes de germinación de las cápsulas.

En otros casos se ha observado limitación del crecimiento de los embriones debido a la no disponibilidad de oxígeno, pues en muchos casos debido a la rigidez el gel interrumpe el intercambio gaseoso del embrión. Para solucionar este problema se ha añadido carbón activado al endospermo sintético, pues se le atribuye un aumento en la difusión de los gases y mejora la respiración (Maruyama *et al.*, 1997). Lu *et al.* (1990) señalan en trabajos con embriones somáticos de zanahoria que la adición de carbón activado al 0.5% a la cápsula incrementó el porcentaje de germinación de los embriones y que estos sobrevivieron un mes a temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sin reducir la capacidad de germinación.

2.6.3. Calidad del endospermo sintético

El endospermo sintético es el encargado de proteger y nutrir al embrión hasta que este germine y sea capaz de vivir de forma independiente, puede contener, además de los nutrientes, las sustancias reguladoras del crecimiento, agentes protectores contra microorganismos patógenos, herbicidas, agentes microbianos benéficos (bioestimuladores), biocontroles y biofertilizantes. (Garret *et al.*, 1991).

Sanada *et al.* (1993) plantean que las semillas naturales se pueden clasificar según el tejido de reserva que suministre los nutrientes para la germinación en albuminosas o exalbuminosas, esta clasificación depende principalmente del tipo de nutriente reservado en mayor magnitud, que en un caso puede ser el almidón y en otro un aceite. Hay especies que muestran características intermedias, de ahí que sea tan difícil producir un endospermo sintético que satisfaga los requerimientos y sea aplicable a la mayoría de las especies.

Para suministrar la fuente de carbono al embrión o las yemas encapsuladas se pueden emplear dos métodos, primero, añadir polisacáridos hidrosolubles enzimáticamente, como el almidón, y



segundo, adicionando compuestos de bajo peso molecular como la sacarosa, este último aspecto es el que más se ha trabajado ya sea añadiéndola dentro o sobre la superficie de la cápsula (Redenbaugh *et al.*, 1987; Fujii *et al.*, 1992; Sanada *et al.*, 1993).

Redenbaugh *et al.* (1987) en alfalfa obtuvieron mejor respuesta adicionando almidón de papa y de *Zea mays* (L) (maíz) que con el medio de cultivo de germinación con maltosa. Por otro lado Agramonte (1999), demostró la necesidad de utilizar sacarosa en el medio de encapsulación de yemas de papa.

El empleo de sacarosa como fuente de energía incrementa los riesgos de contaminación de las semillas sintéticas, ya que favorece la presencia y proliferación de microorganismos. Por lo tanto se han estudiado otras vías para inhibir este efecto, como es el caso de la microencapsulación de la fuente de carbohidrato para luego ser aplicada en la superficie o dentro de la cápsula (Fujii *et al.*, 1992; Sanada *et al.*, 1993). La ventaja de este método consiste en que la liberación ocurre de forma gradual, dependiendo la velocidad de liberación del espesor que tenga la microcápsula (Sakamoto *et al.* 1995).

Una de las prácticas más usuales en todos los trabajos con semilla artificial para determinar la composición del endospermo sintético es utilizar los mismos medios de cultivo empleados para la germinación *in vitro* de los embriones somáticos de la especie en cuestión y, cuando es necesario, sobre la base de este medio se puede ir mejorando la composición a través de la adición exógena de diferentes elementos que constituyen fuentes de carbono (sacarosa, almidón), fuentes de fósforo y de hierro, productos naturales (agua de coco, extracto de semillas), adición de estimuladores del crecimiento, etc.

2.7. Protección de la cápsula contra el ataque de microorganismos.

La cápsula contiene un medio rico en nutrientes y azúcares, lo cual la hace susceptible al ataque de agentes patógenos tales como hongos, bacterias e insectos, por lo que se hace



necesario la aplicación de agentes protectantes. Se pueden utilizar para estos fines dos tipos de control: el control químico y el control biológico.

Molle *et al.* (1993) reconocen tres grandes familias de compuestos utilizados en la protección de la semilla sintética. Estos son los biocidas, los bactericidas y los fungicidas. Los biocidas son compuestos de amplio rango de acción, pero por lo general deben ser usados en concentraciones muy bajas, pues pueden provocar toxicidad y afectar el crecimiento del embrión. De todos los fungicidas probados se recomiendan el benomyl o carbendazim porque no son tóxicos en dosis bajas ($1-5 \text{ mg.L}^{-1}$), aunque no logran controlar todos los géneros de hongos; en el caso de los antibióticos tenemos que las cefalosporinas no son tóxicos y algunas veces estimulan el crecimiento. Otros tipos de antibióticos como la tetraciclina y el cloranfenicol, tienen efecto negativo sobre el crecimiento del embrión. Los que mejores resultados han mostrado son el Cefotaxin y la Ampicillina, pero en general todos estos antibióticos son muy costosos.

Al endospermo sintético se le puede añadir microorganismos beneficiosos que la protegen contra otros microorganismos como es el caso de *Trichoderma* el cual es un hongo antagonista de otros hongos en el suelo y *Pseudomonas* es otro género capaz de proteger al propágulo contra *Phytium* y *Fusarium*, y en el caso específico de la papa contra *Erwinia*.

Bapat y Rao (1993) añadieron tres tipos de fungicidas como el Carbendazim, Benomyl y Bavistin al medio de cultivo de encapsulación de la matriz de yemas encapsuladas de mora en condiciones no estériles, el mejor resultado obtenido cuando se aplicó Carbendazim y Benomyl con dosis de 50.0 mg.L^{-1} , logrando un 63.3 y un 30.0% de germinación respectivamente ejerciendo un efecto protector sobre las cápsulas. Zhang *et al.*, (1990) señalan el control de la contaminación y un mejoramiento de la germinación de la cápsula de 0.0 a 63.0% utilizando preservativos y un medio de cultivo con agar, encapsulando en condiciones no estériles con costos mínimos en comparación con los antibióticos.



Vilariño *et al.* (1996), utilizando yemas de papa, estudió el efecto de los fungicidas Benomyl y TMTD en tres formas de aplicación: por inmersión de las yemas antes de la encapsulación, por inmersión de la cápsula y añadiéndolo en la matriz gelificada. La mejor forma de aplicación fue por inmersión de la yema durante 20 minutos en una solución de Benomyl en concentración de 0.1% de ingrediente activo donde se logró un 90% de germinación.

Agramonte *et al.*, 1999 señalan en la esterilización química de los medios de cultivos durante la micropropagación *in vitro* de caña de azúcar, papa, banano y piña, el empleo de una sustancia química denominada Vitrofur, la cual posee un con amplio espectro de acción antimicrobiano, destacan que la adición de este compuesto a razón de 35 mg.L⁻¹ al medio de cultivo, fue capaz de controlar la incidencia de contaminantes en el medio de cultivo, posibilitando eliminar el autoclaveo de los mismos, señalan además, que en aquellos tratamientos donde se añadió este compuesto los explantes manifestaron mayor crecimiento y vigor que los cultivado en los medios de cultivos esterilizados con calor.

2.8. Técnicas más empleadas para mejorar la cápsula.

Para mejorar la estructura de la cápsula se han desarrollado varios procedimientos como el “self breaking”, donde las cápsulas una vez endurecidas en cloruro de calcio son enjuagadas con agua corriente estéril y después son sumergidas en una solución de cationes monovalentes, por ejemplo nitrato de potasio, seguido de otro enjuague con agua corriente. Posteriormente son plantadas en condiciones de humedad y las cápsulas gradualmente comienzan a hincharse, se vuelven frágiles y finalmente se rajan espontáneamente quedando el embrión al descubierto (Sakamoto *et al.* 1995).

Le Deuff, (1993) describe un proceso denominado priming o preparación, el cual consiste en remojar e hidratar las semillas por varios días en polietilene glicol (PEG) o en soluciones minerales que tengan potenciales aproximadamente de 1M. Las sales más utilizadas son el



KNO_3 , K_3PO_4 , KH_2PO_4 , KCl , MH_4NO_3 y los nitratos de sodio. Estas sales pueden emplearse individualmente o mezcladas. La aireación o el aumento de la tensión de oxígeno en la solución ha tenido efectos beneficiosos en muchas especies. Este tratamiento puede ser aplicado a la cápsula antes o después del proceso de recubrimiento.

Ramamoorthy y Ramanujan, (1993) señalan que previo al proceso de encapsulación remojaron ápices de caña de azúcar durante seis horas en una solución al 1.0% de una mezcla de KH_2PO_4 y KCl , según estos autores este fenómeno se debió fundamentalmente a tres factores, primero a la disminución del daño por desecación mediante la hidratación de los propágulos, segundo al mantenimiento de la turgencia de las células de todos los tejidos y fundamentalmente en los de la raíz y el tallo, lo cual es un prerequisite para la actividad mitótica y la diferenciación de los tejidos a partir de células meristemáticas y tercero, al enriquecimiento de las células con iones de fósforo y potasio los cuales promueven la actividad de las catalasas y de la ATPasa, que acelera el crecimiento de la raíz y el tallo. Además, está muy bien definido el papel de los iones de fósforo y potasio en el mecanismo de tolerancia al stress, esto se puede lograr con la adición de celulosa a la cápsula, la cual constituye una fuente de fósforo.

2.9. Plantación de semillas sintéticas en condiciones *in vivo*.

El paso más crítico en la tecnología de la semilla sintética es la formación de plantas a partir de brotes o embriones encapsulados bajo condiciones no estériles, además para que la semilla artificial sea costeable se necesita disminuir los costos de adaptación a condiciones naturales, contrarrestando los gastos ocasionados durante el cultivo *in vitro* (Fujii *et al.*, 1989). La germinación de las semillas sintéticas en suelo, puede realizarse en cámaras incubadoras en condiciones *in vitro* o en ambientes menos controlados como invernaderos, umbráculos o campo. Un requisito indispensable para todos estos es que las unidades encapsulables (embriones somáticos o yemas) germinen rápidamente y emitan sus raíces, tallos y hojas para



formar un planta completa. Solo muy pocos trabajos describen esta habilidad para la conversión en condiciones *ex vitro*.

Sin embargo, como se ha explicado con anterioridad aún resta por mejorar la calidad del embrión y la propia tecnología de encapsulación, por lo que se dificulta lograr lo que sería el sistema ideal de semilla sintética, que es poder plantar directamente las cápsulas a nivel de campo. No obstante una posibilidad que puede ser explotada, tomando como base los resultados que han sido logrados, es la de plantar semillas sintéticas en bandejas o contenedores para producir plantas utilizando invernaderos o las áreas de aclimatización de los laboratorios comerciales, lo cual significaría un paso extraordinario en el incremento de la eficiencia de los actuales métodos de propagación.

Las condiciones ambientales constituyen uno de los factores que más afectan la conversión de las cápsulas. Fujii *et al.* (1989) probaron varios ambientes para la adaptación a suelo de semillas sintéticas de alfalfa y no observaron diferencias en la conversión entre las cámaras de crecimiento y el invernadero, pero las plantas producidas en este último presentaron un crecimiento más vigoroso. A nivel de invernadero estudiaron varios métodos de irrigación, logrando porcentajes de conversión superiores a las cámaras de crecimiento con el empleo de aspersores y cámaras de humedad, 36.0 y más de 60.0% de conversión respectivamente. Estos autores concluyen que la producción de trasplantes a gran escala utilizando semillas sintéticas puede realizarse en invernaderos donde se pueda mantener una elevada humedad con el empleo de nebulizadores (foggers) u otro tipo de riego fino.

Redenbaugh *et al.*, (1993) durante la plantación en condiciones *ex vitro* de embriones somáticos encapsulados de alfalfa emplearon varios sistemas para lograr la aclimatización, entre los que se incluye el empleo de un sistema hidropónico, cámaras de crecimiento e invernadero, los mayores valores de conversión se obtuvieron cuando se empleó el pabellón



humidificado, lo cual indica que el mantenimiento de la humedad en el suelo es un factor esencial para la supervivencia de los embriones somáticos encapsulados.

Se han empleado las máquinas sembradoras comerciales para granos y en otros casos se han diseñado máquinas especiales muy sofisticadas, pero poco prácticas para la plantación de las semillas sintéticas. Redenbaugh *et al.* (1991) utilizaron una máquina sembradora Stanhay para sembrar cápsulas de alfalfa en canteros, las semillas fueron tratadas con Tullanox, un polvo para facilitar el flujo de estas en el equipo, pero la conversión fue muy baja debido probablemente a los daños sufridos por los embriones somáticos encapsulados en condiciones *ex vitro*.

Se han realizado numerosos intentos por lograr la siembra directa de las cápsulas en condiciones de campo, pero hasta la fecha los resultados han sido poco alentadores (McKersie y Brown, 1996). La tecnología comercial de la semilla artificial aún no es aceptable y en el cultivo de la caña de azúcar no existen referencias en la literatura sobre la conversión exitosa de embriones somáticos encapsulados.

2.9.1. Variación Somaclonal.

La variación somaclonal u obtención de plantas fuera de tipo ha sido señalada desde los inicios del cultivo de tejidos *in vitro* (Swartz, 1991). Las causas que provocan esta variación pueden ser manejadas tanto en el cultivo *in vitro* como en la propagación masiva para el mejoramiento genético. Estas variaciones pueden tener su origen en tres causas fundamentales: cambios pre-existentes en la planta donadora (quimeras que se expresan debido a la proliferación rápida adventiva), cambios genéticos verdaderos (mutaciones) y cambios epigenéticos o efectos fisiológicos (cambios en el fenotipo que no son heredables) (Pérez, 1998).

La estabilidad genética de las plantas cultivadas *in vitro* puede garantizarse con un sabio dominio de los factores que inciden sobre ella, estos son en la actualidad bastante conocidos y



pueden ser manejados durante el cultivo *in vitro*, entre ellos tenemos el genotipo, el explante, la edad del cultivo *in vitro*, el medio de cultivo y el sistema de regeneración empleado. Esta última tiene un efecto directo sobre la variabilidad somaclonal.

Scrowcoft (1984) clasificó los sistemas de regeneración de forma ascendente, en cuanto a la variabilidad, de la forma siguiente: micropropagación vía yemas axilares, yemas adventicias, callos embriogénicos, organogénicos, suspensiones celulares y protoplastos. La gran mayoría de los autores coinciden con este enfoque y plantean que está muy relacionado con el grado de dediferenciación de las distintas formas de regeneración y los métodos de cultivo (Pérez 1992).

En caña de azúcar Bonnel y Rosques (1988) compararon los cambios morfológicos y fisiológicos provocados por el cultivo *in vitro* de callo y yemas axilares en tres variedades y plantean que no hubo variación genética discernibles y que la variación somaclonal y clonal fueron de la misma magnitud. Jiménez (1995) durante la micropropagación *in vitro* de la caña de azúcar concluye, al comparar morfológica y fisiológicamente las poblaciones de plantas micropropagadas *in vitro* vía yemas axilares, derivadas de embriones somáticos y propagadas por estacas, que las plantas micropropagadas mostraron coeficientes de variación mayor que el testigo propagado por estacas para la mayoría de los caracteres evaluados, siendo mayor a medida que se dan más subcultivos *in vitro*, pero que esta variabilidad no tiene base genética ya que tiende a desaparecer con los ciclos de multiplicación en campo y que las plantas regeneradas de embriones somáticos presentaron un comportamiento similar a las plantas micropropagadas vía yemas axilares, caracterizado por un incremento en el número de tallos.

Las principales alteraciones observadas en las plantas de caña de azúcar propagadas *in vitro* se manifiestan con un incremento en el número de tallos y del vigor, retardo en la floración, menor incidencia de enfermedades sistémicas (raquitismo, escaldadura, VMCA) que la semilla tradicional y siempre han sido infecciones secundarias (Flynn y Anderlini, 1990), no obstante ha



sido señalado que las mismas muestran un aumento de la susceptibilidad a la roya (Peros y Bonnel, 1990), entre otras características que influyen en el rendimiento y que son el resultado del rejuvenecimiento o cambios temporales que tienen lugar durante el cultivo *in vitro* (Pérez., 1998).



Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos.

Procedimientos generales de trabajo.

Formación de los callos.

Se seleccionaron plantas en campo de la variedad Cuba 87 – 51 de tres meses de edad y sintomatológicamente sanas, a las muestras seleccionadas se le 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) complementado con 3.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D y gelificado con 7.0 g.L⁻¹ de agar, en el cual permanecieron durante 21 días.

La composición específica de los medios de cultivo se define en cada experimento, el pH siempre se ajustó a 5.6 previo a la esterilización. Los medios de cultivo semisólidos fueron distribuidos a razón de 30 mL en frascos de cristal de 250 mL de capacidad y esterilizados en autoclave a 121 °C de temperatura y 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 20 minutos.

Multiplicación de los callos.

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) complementado con 3.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D y gelificado con 8.0 g.L⁻¹ de agar, en el cual permanecieron durante tres semanas.

Inducción de embriones somáticos.

Tesis de Maestría



Los callos fueron transferidos al medio de inducción de embriones compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962) complementado con 1.0 mg.L^{-1} de 2,4-D, 50.0 mL.L^{-1} de agua de coco, 100 mg.L^{-1} de mioinositol y 8.0% de sacarosa y gelificado con 9.0 g.L^{-1} 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 $28 \pm 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.

Germinación de los embriones somáticos.

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 $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y $28 \pm 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura. Transcurrido este tiempo los embriones somáticos similares a los que se muestran en la foto 1, fueron separados de los callos y utilizados para los experimentos de germinación en medio de cultivo semisólido y de encapsulación (Foto 1).

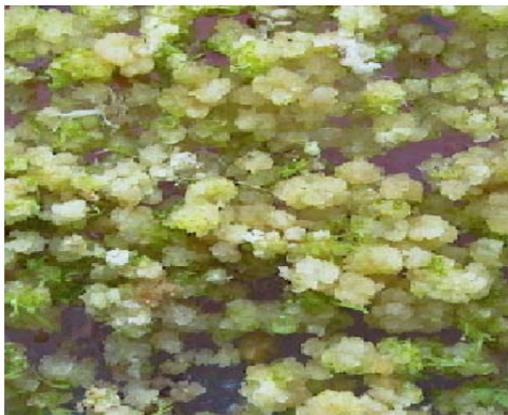


Foto 1. Material vegetal utilizado para la encapsulación (embriones somáticos de callos cultivados en medio semisólido).

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 que contenía 3.0% de alginato de sodio (Fluka Chemie) y medio de cultivo de germinación, el cual estuvo compuesto por sales MS, 1.0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 100 mL.L⁻¹ de agua de coco, 2.0% de sacarosa. Esta mezcla fue previamente autoclaveada y con ayuda de una micropipeta automática (pipettboy) y una pipeta graduada de 10 mL de capacidad se dejó caer gota a gota 0.5 mL de esta mezcla sobre una solución 110 mM de CaCl₂, asegurando que en cada gota hubiese un embrión (Foto 2). El tiempo de acomplejamiento de las cápsulas en CaCl₂ se determinó en el experimento 3.1. Las cápsulas que se formaron fueron enjuagadas con agua desionizada y distribuidas en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad con papel de filtro humedecido con agua desionizada estéril como soporte. Los frascos con embriones somáticos encapsulados fueron incubados en cámaras de crecimiento de luz solar a 28 ± 2.0 °C de temperatura.



Foto 2. Proceso de encapsulación de los embriones somáticos.

Evaluación de los experimentos y procesamiento estadístico de los datos.



En todos los experimentos *in vitro* y *ex vitro* se tomó como principales criterios de evaluación la germinación de los embriones somáticos (número de embriones somáticos (desnudos o encapsulados) que son capaces de emitir hojas y/o raíces bajo condiciones *in vitro*) y la conversión (número de embriones somáticos que son capaces de formar plantas en condiciones *ex vitro*), ambas expresadas en porcentajes.

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente a través de prueba de MDS, ANOVA simple, análisis de varianza bifactorial y las diferencias entre las medias estadísticas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

3.1. Estudio de la composición del endospermo sintético.

3.1.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción en CaCl₂ sobre la germinación de los embriones somáticos.

Con el objetivo de determinar la concentración de alginato de sodio y CaCl₂ necesarios para lograr una adecuada germinación de los embriones somáticos encapsulados, se probaron tres concentraciones de alginato de sodio para la confección de la matriz endurecida (3.0, 3.5 y 4.0%) y dos tiempos de reacción en CaCl₂ (15 y 20 min.). Se distribuyeron cinco cápsulas por frasco de cultivo con 10 frascos por tratamiento.

El medio de encapsulación estuvo compuesto por las sales MS, 1.0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg de mioinositol, 100 mL.L⁻¹ de agua de coco y 2.0% de sacarosa.

Las evaluaciones se realizaron a la tercera semana de cultivo, evaluándose el porcentaje de germinación. Con el objetivo de comprobar la calidad de los embriones somáticos encapsulados se incluyó un control que consistió en embriones somáticos desnudos colocados sobre medio de cultivo de germinación semisólido de igual composición que el medio de encapsulación.

Se sembraron cinco embriones somáticos por frasco de cultivo de 250 mL de capacidad y se colocaron 10 frascos en condiciones de germinación.



3.1.2. Efecto de la concentración del agua de coco en el endospermo sintético sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de agua de coco (0, 100, 120, 140, 160 y 180 mL.L⁻¹) en el endospermo sintético, para ello se añadieron de forma independiente las diferentes concentraciones al medio de germinación. Se emplearon seis frascos con cinco embriones somáticos encapsulados por cada tratamiento y una variante control con embriones somáticos desnudos sobre medio de cultivo semisólido en condiciones similares al experimento anterior. Se sembraron cinco embriones somáticos por frasco de cultivo de 250 mL de capacidad y se colocaron seis frascos como réplica. El diseño del experimento estuvo compuesto en total por siete tratamientos con 30 embriones somáticos cada uno.

- A)- Embriones somáticos desnudos sobre medio de cultivo semisólido (control).
- B)- Embriones encapsulados en medio de germinación sin agua de coco.
- C)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 100 mL.L⁻¹ de agua de coco.
- D)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 120 mL.L⁻¹ de agua de coco
- E)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 140 mL.L⁻¹ de agua de coco
- F)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 160 mL.L⁻¹ de agua de coco
- G)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 180 mL.L⁻¹ de agua de coco

A las tres semanas de cultivo fue evaluado el porcentaje de germinación.

3.1.3. Influencia del AG₃ 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 AG₃ (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.L⁻¹), las cuales fueron añadidas al medio de germinación compuesto por sales MS, 1.0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100



mg de mioinositol, 180 mL.L⁻¹ de agua de coco y 2.0% de sacarosa. Se colocaron cinco embriones encapsulados por frasco de cultivo y se distribuyeron diez frascos por tratamiento. Al igual que en los experimentos anteriores se incluyó un control con embriones desnudos sobre medio de cultivo de germinación semisólido.

El experimento contó con un total de siete tratamientos de 50 embriones somáticos cada uno.

- A)- Embriones somáticos en medio de germinación con medio de cultivo semisólido
- B)- Embriones somáticos desnudos en medio de cultivo semisólido (control).
- C)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 0.5 mg.L⁻¹ de AG₃
- D)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 1.0 mg.L⁻¹ de AG₃
- E)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 1.5 mg.L⁻¹ de AG₃
- F)- Embriones encapsulados en medio de germinación con 2.0 mg.L⁻¹ de AG₃

A la segunda y tercera semana de cultivo, se evaluó el porcentaje de germinación.

3.1.4. Influencia del AG₃ y el 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

Se analizó el efecto de cuatro concentraciones de AG₃ (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.L⁻¹) combinadas con 0.2 mg.L⁻¹ de 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados, las diferentes concentraciones fueron adicionadas de manera independiente en el medio de cultivo de germinación de igual composición que el experimento anterior, el cual estuvo compuesto por las sales MS, 1.0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg de mioinositol, 180 mL.L⁻¹ de agua de coco y 2.0% de sacarosa. Se colocaron cinco embriones encapsulados por frasco de cultivo y se distribuyeron diez frascos por tratamiento.

Se incluyó un control con embriones desnudos sobre medio de cultivo de germinación semisólido de igual composición que los experimentos anteriores. El diseño del experimento fue



idem al anterior con la única diferencia que los tratamientos C, D, E y F contenían 0.2 mg.L^{-1} de 6-BAP.

Las evaluaciones se realizaron a la segunda y tercera semana de cultivo, evaluándose el porcentaje de germinación.

3.2. Protección química de la cápsula.

Teniendo en cuenta, que el Vitrofurul (G-1/PEG 6000) es un compuesto antimicrobiano de amplio espectro, que ha sido utilizado para la desinfección química de los medios de cultivo, se estudió el efecto de distintas concentraciones sobre la germinación de embriones somáticos desnudos y encapsulados para evaluar su efecto como protectante químico de la cápsula.

3.2.1. Influencia del Vitrofurul sobre la germinación de los embriones somáticos desnudos.

El Vitrofurul fue añadido en diferentes concentraciones (20.0 , 25.0 , 30.0 , 35.0 y 40.0 mg.L^{-1}) al medio de cultivo, previamente esterilizado y sin esterilizar, el cual estuvo compuesto por las sales MS, 1.0 mg.L^{-1} de tiamina, 100 mg de mioinositol, 180 mL.L^{-1} de agua de coco, 2.0% de sacarosa gelificado con 7.0 g.L^{-1} de agar. Para la adición del Vitrofurul al medio de cultivo sin esterilizar primeramente se dejó hervir el medio de cultivo hasta $100 \text{ }^\circ\text{C}$, cuando la temperatura descendió hasta los $60 \text{ }^\circ\text{C}$ se adicionaron las diferentes concentraciones de Vitrofurul, seguidamente el medio de cultivo fue distribuido a razón de 30 mL en frascos de 250 mL de capacidad, los cuales fueron previamente enjuagados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.05% (v/v), según el procedimiento recomendado por Agramonte *et al.* (1997). Todas las manipulaciones con los embriones somáticos se realizaron en una cabina de flujo laminar. Se colocaron 100 embriones somáticos desnudos por tratamiento a razón de 10 embriones somáticos por frasco, el experimento se diseñó de la siguiente forma:

A)- Medio de cultivo de germinación semisólido.



- B)- Medio de cultivo de germinación esterilizado + 20 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- C)- Medio de cultivo de germinación esterilizado + 25 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- D)- Medio de cultivo de germinación esterilizado + 30 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- E)- Medio de cultivo de germinación esterilizado + 35 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- F)- Medio de cultivo de germinación esterilizado + 40 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- G)- Medio de cultivo de germinación no esterilizado + 20 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- H)- Medio de cultivo de germinación no esterilizado + 25 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- I)- Medio de cultivo de germinación no esterilizado + 30 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- J)- Medio de cultivo de germinación no esterilizado + 35 mg.L⁻¹ de Vitrofurul
- K)- Medio de cultivo de germinación no esterilizado + 40 mg.L⁻¹ de Vitrofurul.

Se evaluó el porcentaje de germinación y la incidencia de contaminantes a la tercera semana de cultivo.



3.2.2. Influencia del Vitrofurax sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

Primeramente se preparó el medio de cultivo líquido el cual estuvo compuesto por las sales MS, 1.0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg de mioinositol, 180 mL.L⁻¹ de agua de coco y 2.0% de sacarosa, el mismo fue dosificado a razón de 150 mL en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad, los cuales fueron expuestos al calor hasta alcanzar los 100 °C, después de cinco minutos a temperatura de ebullición fueron retirados del calor, se dejaron reposar hasta que la temperatura descendió a 60 °C y se adicionaron las diferentes concentraciones de Vitrofurax (20, 25, 30, 35 y 40 mg.L⁻¹), posteriormente se añadió el alginato de sodio al 2.0% y transcurridas 24 horas los embriones somáticos fueron extraídos de los callos con la ayuda de pinzas, bisturíes y un microscopio estereoscópico, mezclados con el alginato de sodio y encapsulados en condiciones *in vivo*. Se emplearon 10 frascos por tratamiento con 10 embriones somáticos encapsulados por frasco y se evaluó el porcentaje de germinación de los embriones somáticos y la incidencia de contaminantes a la tercera semana de cultivo.

3.3. Influencia de la inmersión de las cápsulas en KNO₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

3.3.1. Estudio de diferentes tiempos de inmersión en KNO₃.

Con el objetivo de disminuir la rigidez de la cápsula e incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos encapsulados, estos fueron inmersos en una solución 50 mM de KNO₃. 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 con un total de 50 embriones somáticos por tratamiento. Se incluyó además un control con embriones desnudos en el medio de cultivo semisólido de germinación compuesto por las sales MS, 1.0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg de mioinositol, 180 mL.L⁻¹ de agua



de coco y 2.0% de sacarosa, 0.5 mg.L^{-1} de AG_3 y 0.2 mg.L^{-1} de 6-BAP. Se sembraron cinco embriones somáticos desnudos por frasco y se emplearon diez frascos por tratamiento.

Las evaluaciones se realizaron a la segunda semana de cultivo, evaluándose el porcentaje de germinación.

3.3.2. Influencia de la forma de aplicación del KNO_3 .

De acuerdo a los resultados del experimento anterior se evaluó varias formas de aplicación de la solución de KNO_3 .

Los embriones encapsulados fueron inmersos durante cinco horas en una solución 50 mM de KNO_3 y el diseño del experimento fue de la siguiente forma:

- A)- El alginato de sodio con los embriones somáticos fueron dejados caer gota a gota durante 15 minutos en CaCl_2 (1.1 g.L^{-1}) disuelto en agua y posteriormente sumergidas en una solución 50 mM de KNO_3 disuelto en agua durante cinco horas, transcurrido este tiempo fueron lavadas con agua desionizada.
- B)- El alginato de sodio con los embriones somáticos fueron dejados caer gota a gota durante 15 minutos en CaCl_2 (1.1 g.L^{-1}) el cual se disolvió en el medio de cultivo de encapsulación y posteriormente las cápsulas fueron inmersas en una solución 50 mM de KNO_3 (disuelto en medio de cultivo) durante cinco horas, transcurrido este tiempo las cápsulas fueron lavadas con agua desionizada.
- C)- El alginato de sodio con los embriones somáticos fueron dejados caer gota a gota durante 15 minutos en CaCl_2 (1.1 g.L^{-1}) el cual se disolvió en el medio de cultivo de encapsulación y posteriormente las cápsulas fueron lavadas con agua desionizada.
- D)- El alginato de sodio con los embriones somáticos fueron dejados caer gota a gota durante 15 minutos en CaCl_2 (1.1 g.L^{-1}) disuelto en agua y posteriormente las cápsulas



fueron inmersas en una solución 50 mM de KNO_3 disuelto en medio de cultivo durante cinco horas, transcurrido este tiempo las cápsulas fueron lavadas con agua desionizada

- E)- El alginato de sodio con los embriones somáticos fueron dejados caer gota a gota durante 15 minutos en CaCl_2 (1.1 g.L^{-1}) el cual se disolvió en el medio de cultivo de encapsulación y posteriormente las cápsulas fueron inmersas en una solución 50 mM de KNO_3 disuelto en agua durante cinco horas, transcurrido este tiempo las cápsulas fueron lavadas con agua desionizada.
- F)- El alginato de sodio con los embriones somáticos fueron dejados caer gota a gota durante 15 minutos en CaCl_2 (1.1 g.L^{-1}) disuelto en agua y posteriormente fueron lavadas con agua desionizada.

Se colocaron cinco embriones somáticos encapsulados por frasco de cultivo y se emplearon diez frascos por tratamiento y para un total de 50 embriones por cada tratamiento. Se incluyó un control de embriones desnudos.

Las evaluaciones se realizaron en la segunda semana de cultivo, evaluándose el porcentaje de germinación.

3.4. Plantación de los embriones somáticos encapsulados en área de aclimatización.

Condiciones de presembrado

A partir de ensayos preliminares se determinó que los embriones somáticos debían permanecer *in vitro* durante una etapa de pre-brotación entre siete y diez días, ya que solo eran capaces de adaptarse aquellas plántulas que tenían entre 1.5 – 2.0 cm de longitud. Con el objetivo de lograr la obtención de plantas a partir de los embriones somáticos encapsulados en condiciones *ex vitro* se procedió a la plantación bajo las siguientes condiciones.



Sustratos utilizados

El sustrato utilizado estuvo compuesto por Casting 85% + Zeolita 15% (Pérez *et al.*, 1998). El mismo fue previamente humedecido y fertilizado con fórmula completa NPK y adicionado en bandejas de polieturano de 70 orificios. Las cápsulas fueron colocadas superficialmente sobre el sustrato, evitando que fuesen cubiertas por el mismo.

Condiciones ambientales

- Para el sistema de riego se emplearon microaspersores y los embriones somáticos encapsulados se mantuvieron con una frecuencia de tres riegos diarios (Humedad relativa media del día > 85%)
- Temperatura media del día: 32 °C
- Después de la siembra las cajas fueron colocadas bajo un cobertor forrado con nylon y zarán, lográndose una reducción del 50% de la intensidad solar.

Se evaluó el porcentaje de conversión a las cuatro semanas después de la plantación.

3.5. Evaluación en campo de plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados.

Se estudió el comportamiento en campo de plantas regeneradas vía embriogénesis somática (embriones somáticos encapsulados) en comparación con los protocolos de propagación vía organogénesis (plantas micropropagadas) y estacas tradicionales.

Se empleó un diseño en block al azar con cinco réplicas por tratamiento, las parcelas tenían 7.5 m de largo y cinco surcos cada una. La densidad de plantación cuando se emplearon estacas fue de 12 yemas por metro lineal, con estacas de tres yemas; mientras que las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (embriones encapsulados y plantas micropropagadas) se sembraron a una distancia de 0.50 m (15 plantas por surco). Se aplicó siempre fertilización de fórmula completa en el momento de la siembra: 75 Kg.ha⁻¹ de Nitrógeno, 50 Kg.ha⁻¹ de P₂O₅ y 50 Kg.ha⁻¹ de K₂O; y 75 Kg de Nitrógeno en forma de urea a los tres meses de plantación. A



las plantas *in vitro* se les realizaron riegos de supervivencia dos veces a la semana durante el primer mes. El mismo fue conducido en la Estación Experimental de Remedios del IBP y replicado en el Centro de Semillas e Investigaciones de la Caña de Azúcar del CAI "Uruguay" en la provincia de Sancti Spiritus.

Las evaluaciones se realizaron en caña planta, cuando las plantas tenían 14 meses de edad, evaluándose la altura de los tallos (cm), el diámetro (mm) y el brix. Para determinar el peso y el número de tallos, se cortaron cuatro metros lineales por parcela (dos muestras de dos metros), contándose el número de tallos por muestra y pesando la muestra completa en una balanza de campo.



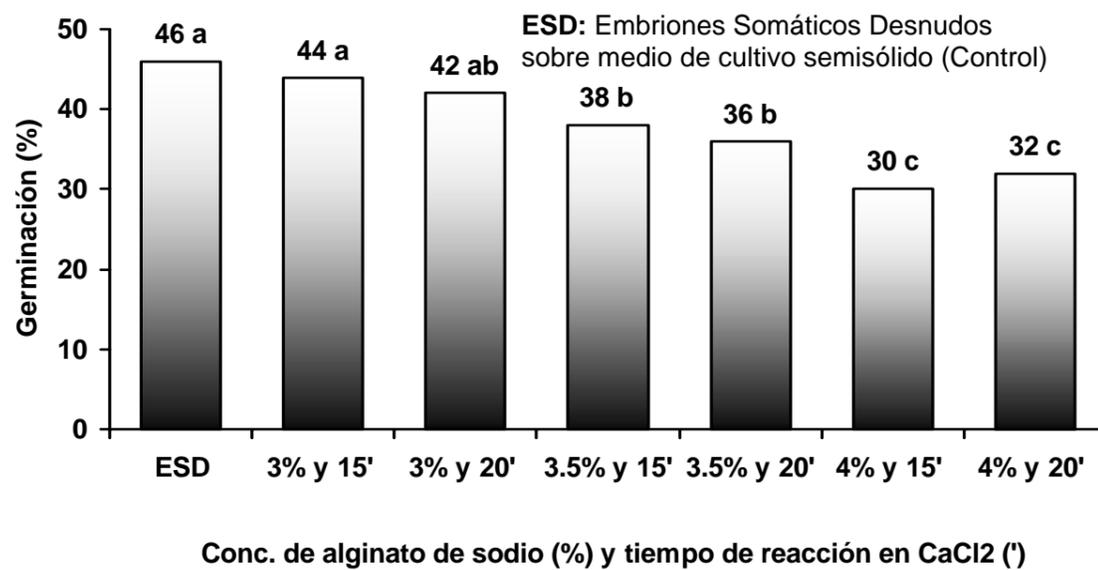
Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión.

4.1. Estudio de la composición del endospermo sintético.

4.1.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción en CaCl_2 sobre la germinación de los embriones somáticos.

Al analizar la interacción entre la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción, se observa, que los valores de germinación más altos, se obtuvieron en aquellos tratamientos donde se empleó 3% de alginato independientemente del tiempo de reacción empleado (44 y 42%), estos valores no difirieron significativamente del control con embriones somáticos desnudos (46%) (figura 1). El tiempo de reacción no influyó significativamente sobre la germinación de los embriones somáticos.



| | |
|-------|---------|
| MG±EE | 1.9±0.1 |
| CV | 11.5 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan

Figura 1. Efecto de la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción en CaCl_2 sobre la germinación *in vitro* de los embriones somáticos a las tres semanas de cultivo.



En todos los tratamientos con embriones somáticos encapsulados se logró la germinación, los embriones somáticos desarrollaron raíces y ápices, los cuales en su crecimiento provocaron la ruptura de la cápsula, dando lugar a pequeñas plántulas.

Se ha observado con frecuencia que no todos los embriones somáticos son capaces de emerger del gel endurecido y germinar, aunque la calidad de estos sea excelente. Según Redenbaugh *et al.* (1987a) las posibles causas de esta inhibición en la germinación, pueden ser, una insuficiente elasticidad por endurecimiento excesivo del gel o también por la falta de oxígeno una vez formada la cápsula. La naturaleza y concentración del alginato de sodio, la concentración del agente acomplejante y el tiempo de duración de la reacción de acomplejamiento, son factores que influyen en la dureza de la cápsula; manejando estos factores se puede conseguir una dureza tal que no inhiba el crecimiento del embrión y a la vez lo proteja de los daños mecánicos durante la manipulación (Redenbaugh *et al.*, 1993).

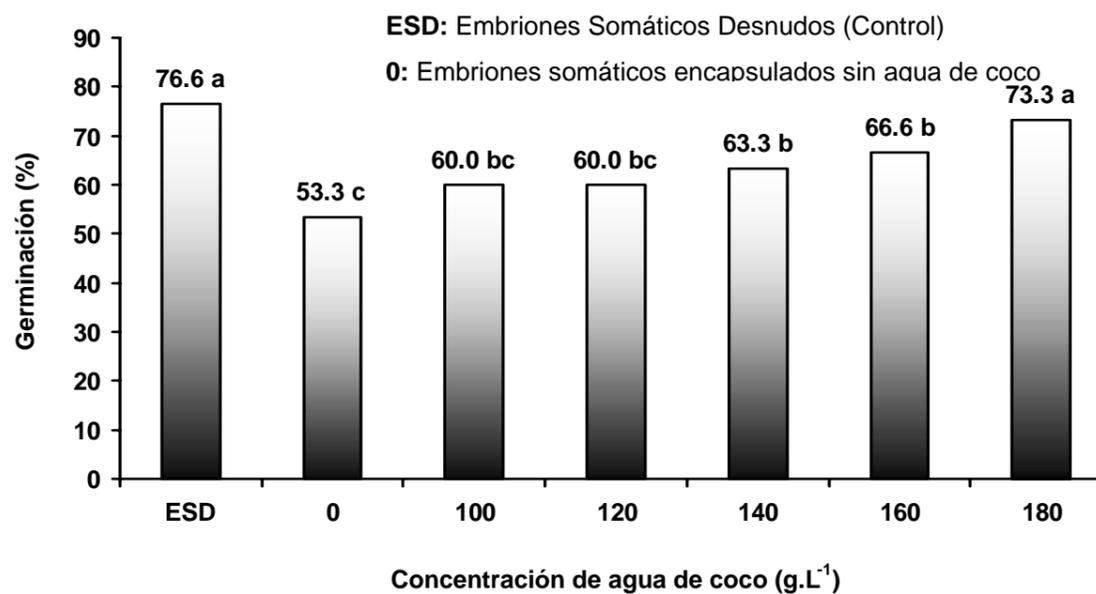
Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los alcanzados por Ganapathi *et al.* (1992) quienes al estudiar el efecto de la concentración de alginato de sodio autoclaveado (2, 3 y 4%) sobre la germinación de los ápices meristemáticos de banano, obtuvieron que a medida que se incrementó la concentración disminuyeron los valores de germinación, el mejor resultado fue obtenido con 3.0% de alginato (100%). Así mismo Suprasanna *et al.* (1996) señalan en la encapsulación de embriones somáticos de arroz obtenidos a partir de callos, que la concentración de 3.0% de alginato autoclaveado fue suficiente para la formación de las cápsulas. Por otro lado Castillo *et al.* (1998) destacan que a medida que aumentó la concentración de alginato de sodio y el tiempo de reacción en CaCl_2 durante el proceso de encapsulación de embriones somáticos de papaya, la frecuencia de germinación disminuyó desde un 77.5 hasta un 46.3%.

A partir de estos resultados se seleccionó la concentración de 3.0% de alginato con 15 minutos de reacción en CaCl_2 para la realización de los demás experimentos.



4.1.2. Efecto de la concentración de agua de coco en el endospermo sintético sobre los embriones somáticos encapsulados.

El agua de coco estimuló la germinación cuando se añadió al endospermo sintético en concentraciones 140, 160 y 180 mL.L⁻¹, obteniéndose porcentajes de germinación superiores al tratamiento sin agua de coco (figura 2). El mayor porcentaje de germinación (73.3%) se obtuvo cuando se empleó 180 mL.L⁻¹ de agua de coco, el cual fue superior a los obtenidos en los demás tratamientos con embriones somáticos encapsulados y similar al control con embriones somáticos germinados sobre medio de cultivo semisólido (76.6%).



| | |
|---------|-------------|
| MG ± EE | 3.76 ± 0.12 |
| CV | 17.8 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan.

Figura 2. Efecto de la concentración del agua de coco en el endospermo sintético sobre la germinación *in vitro* de los embriones somáticos encapsulados a las tres semanas de cultivo.

Algunos autores como Payán *et al.* (1977) destacan que en la embriogénesis somática de la caña de azúcar los suplementos orgánicos como el agua de coco juegan un importante papel y



recomiendan el empleo de un medio de cultivo MS libre de hormonas, suplementado con 180 mL.L⁻¹ de agua de coco para la regeneración de plantas a partir de callos.

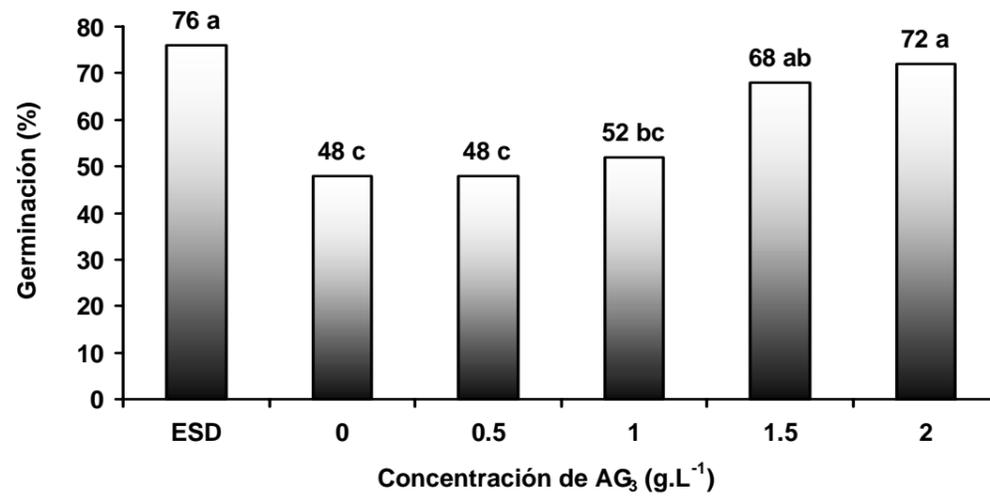
Según Alhoowalia y Marezki, (1983) y Vasil (1985) el agua de coco es un extracto natural, que ha tenido gran influencia en el proceso de embriogénesis somática de esta gramínea, recomendando su uso en concentraciones que oscilan entre 5 – 10%. Dix y Van Staden, (1982) y Jiménez, (1995) en la micropropagación de la caña de azúcar encontraron que el agua de coco tuvo un efecto auxínico, similar al AIA. Sin embargo este componente natural además de su comprobado contenido de reguladores del crecimiento es rico en elementos nutritivos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos y otros elementos nitrogenados (Krikorian, 1993), los cuales pueden constituir un aporte esencial en el endospermo sintético de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar.

Krikorian, (1993) atribuye el efecto estimulador del agua de coco sobre los tejidos cultivados *in vitro*, a que en el coco gran cantidad del endospermo líquido (agua de coco) se desarrolla precozmente y almacena nutrientes para el embrión en desarrollo, mientras el embrión siga latente el agua de coco inducirá la división celular. Otros autores como Heinz y Mee (1969); Pérez (1988); Gómez (1996) y Freire *et al.* 1999, señalan el uso de este componente natural tanto en la micropropagación de la caña de azúcar como en la formación de callos y la obtención de embriones somáticos en esta gramínea.

4.1.3. Influencia del AG₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

La concentración de AG₃ influyó significativamente sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados (figura 3), pues a medida que se incrementó la concentración de este regulador del crecimiento en el endospermo sintético, aumentó la germinación de los embriones somáticos.





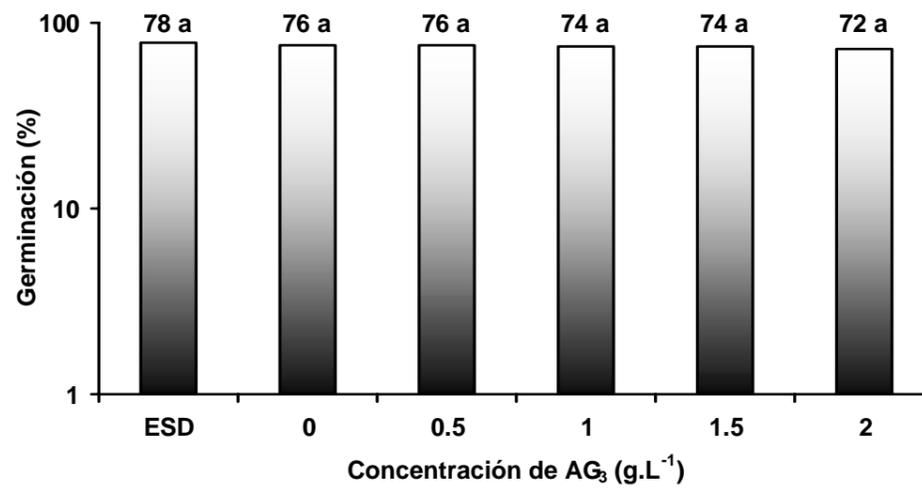
ESD: Embriones Somáticos Desnudos (Control)

0: Embriones somáticos encapsulados sin AG₃

| | |
|---------|-----------|
| MG ± EE | 3.0 ± 0.3 |
| CV | 19.9 % |

(a,b,c), barras con letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Duncan

Figura 3. Efecto del AG₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar en la segunda semana de cultivo.



ESD: Embriones Somáticos Desnudos (Control)

0: Embriones somáticos encapsulados sin AG₃

| | |
|---------|-----------|
| MG ± EE | 3.75±0.23 |
| CV | 9.4 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Duncan

Figura 4. Efecto del AG₃ sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar a las tres semanas de cultivo.





Foto 3. Embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar en la segunda semana de cultivo.

Resultados similares fueron obtenidos por Tapia *et al.* (1998), los cuales obtuvieron durante la encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar de la variedad Canal Point 52 – 43, que el AG₃ incrementó la germinación de los embriones somáticos y recomiendan como mejor dosis 2.0 mg.L⁻¹.

Según Krikorian, (1993) el AG₃ es capaz de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, aunque en la mayoría de los cultivos los niveles de AG₃ superiores a 1.0 mg.L⁻¹ son tóxicos por lo que debe utilizarse en bajas concentraciones, por otro lado autores como Janeiro *et al.* (1997) destacan que la adición de AG₃ al endospermo sintético de *Camelia japonica* incrementó los porcentajes de germinación (63%) con respecto a aquellos tratamientos donde no se adicionó (42%).

Antonietta *et al.* (1999) señalan que la presencia del AG₃ en el endospermo de embriones somáticos encapsulados de *Citrus reticulata* Blanco fue indispensable para la germinación,



incrementándose estos valores de un 5.0% (endospermo sin AG₃) a un 25% cuando estuvo presente este regulador del crecimiento.

Teniendo en cuenta la etiolación y fenolización presentada en los tratamientos con dosis de AG₃ superiores a 1 mg.L⁻¹ AG₃, provocado al parecer por las altas concentraciones de este regulador del crecimiento, se procedió a aplicar otros reguladores del crecimiento como el AIA, ANA, brasinoesteroide y el 6-BAP, con el objetivo de disminuir la concentración de este regulador del crecimiento sin afectar la velocidad y porcentajes de germinación alcanzados. Se debe destacar que solo se obtuvieron resultados significativos cuando se combinaron diferentes concentraciones de AG₃ y 6-BAP (0.2 mg.L⁻¹).

4.1.4. Influencia del AG₃ y el 6-BAP sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

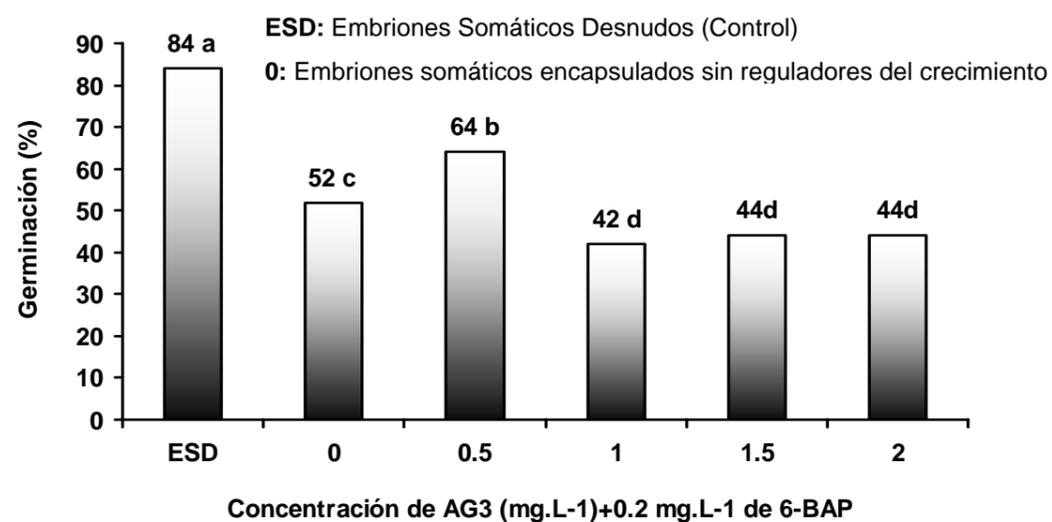
La adición de 6-BAP mejoró las características fisiológicas de las plantas obtenidas cuando se combinó con la dosis más baja de AG₃ (0.5 mg.L⁻¹) las plantas no mostraron síntomas de etiolación y la presencia de fenoles fue escasa. Se obtuvo además con esta dosis el mayor porcentaje de germinación (64%) en la segunda semana de cultivo, mostrando diferencias significativas con respecto al control sin regulador del crecimiento (52%) y al control con embriones somáticos desnudos (84%) (figura 5).

El efecto de concentraciones superiores a 0.5 mg.L⁻¹ de AG₃ combinado con 0.2 mg.L⁻¹ de 6-BAP fue detrimental para la germinación de los embriones somáticos encapsulados, esta disminuyó de un 64 a un 44% cuando se incrementó la dosis de AG₃, obteniéndose plantas etioladas y cápsulas con presencia de fenoles, comportamiento que se mantuvo igual durante la tercera semana de cultivo. Aunque en la tercera semana de cultivo no existió diferencias significativas entre el tratamiento con mejores resultados (0.5 mg.L⁻¹ de AG₃ + 0.2 mg.L⁻¹ de 6-BAP) con respecto al tratamiento sin regulador del crecimiento (figura 6), se mejoró la velocidad



de germinación como se observa en la segunda semana de cultivo donde si se observaron diferencias significativas entre ellos, además se logró eliminar en este tratamiento el problema de la etiolación y la presencia de fenoles en las plantas obtenidas en los tratamientos con AG₃ del experimento anterior.

Este efecto del 6-BAP combinado con el AG₃ puede estar provocado por un efecto sinérgico de estos dos reguladores del crecimiento, algunos autores como Barcelló *et al.* (1995) observaron que las citoquininas como el 6-BAP estimularon el alargamiento de células en discos de hojas etioladas, cuyo efecto no se pudo lograr con auxinas. Según este autor, las citoquininas al parecer, impiden la desaparición de las giberelinas, lo cual fue comprobado al comparar hojas de plantas de trigo tratadas con citoquininas en las que el nivel de giberelina encontrado fue mayor que el de las no tratadas.

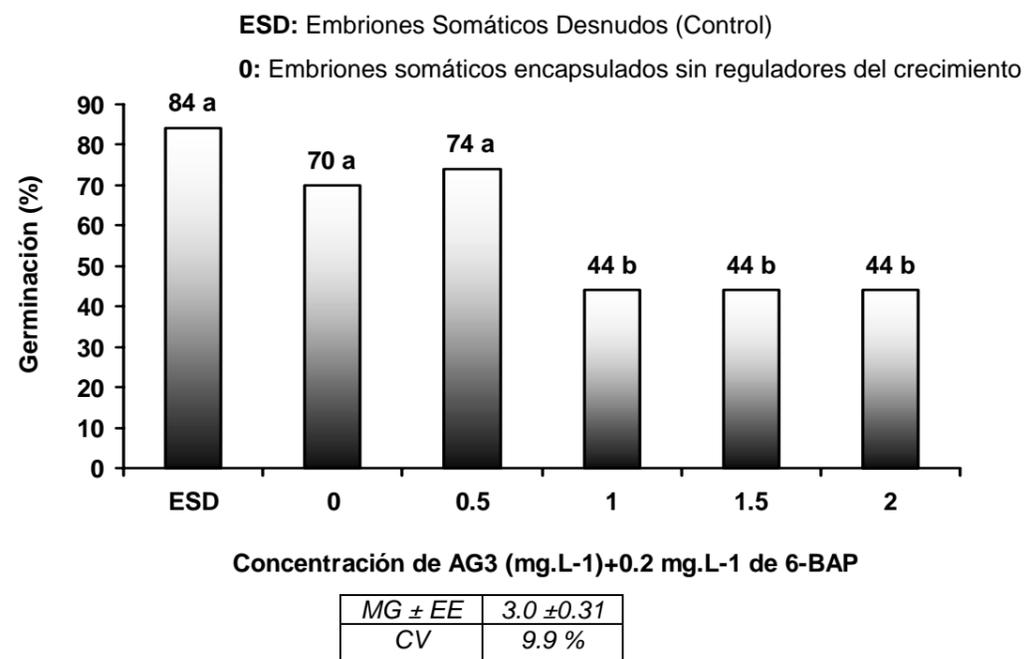


| | |
|---------|-----------|
| MG ± EE | 2.7 ± 0.1 |
| CV | 20.5 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Duncan

Figura 5. Efecto de la combinación de distintas concentraciones de AG₃ y el 6-BAP (0.2 mg.L⁻¹) sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar en la segunda semana de cultivo.





(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

Figura 6. Efecto de la combinación de distintas concentraciones de AG₃ y el 6-BAP (0.2 mg.L⁻¹) sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar a las tres semanas de cultivo.

Gray y Purohit (1991) señalan que la aplicación de AG₃ y de citoquininas al medio de cultivo aceleraron el crecimiento y la germinación de los embriones somáticos de *Vitis longuui* (pasto).

Autores como Gnanapragasan y Vasil, (1990) utilizan en el medio de cultivo para la germinación de los embriones somáticos de caña de azúcar 0.23 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 0.25 mg.L⁻¹ de kinetina y similar dosis de zeatina, por otro lado Lee (1987) destaca que el 6-BAP es empleado en casi todos los medios de micropropagación reportados para el cultivo de la caña de azúcar, en concentraciones que oscilan entre 0.1 – 0.624 mg.L⁻¹, en dependencia de si es empleado solo o combinado con otros reguladores del crecimiento.

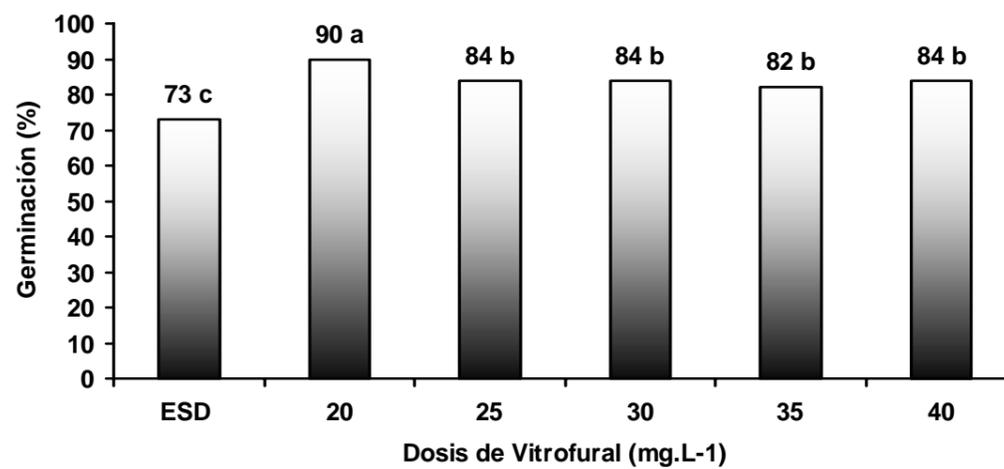


4.2. Protección química de la cápsula.

4.2.1. Influencia del Vitrofuroral sobre la germinación de los embriones somáticos desnudos.

El empleo del Vitrofuroral resultó efectivo para la esterilización química de los medios de cultivo semisólidos, ya que en ninguno de los tratamientos ni concentraciones estudiadas se manifestó contaminación microbiana.

El análisis bifactorial mostró que existieron diferencias significativas tanto para la dosis como para forma de aplicación del Vitrofuroral. Los mayores valores de germinación se alcanzaron cuando se empleó 20 mg.L⁻¹, la germinación disminuyó cuando la concentración se elevó por encima de 20 mg.L⁻¹, aunque estos valores de germinación se mantuvieron superiores al control sin vitrofuroral (figura 7).



ESD: Embriones Somáticos Desnudos *sin vitrofuroral*

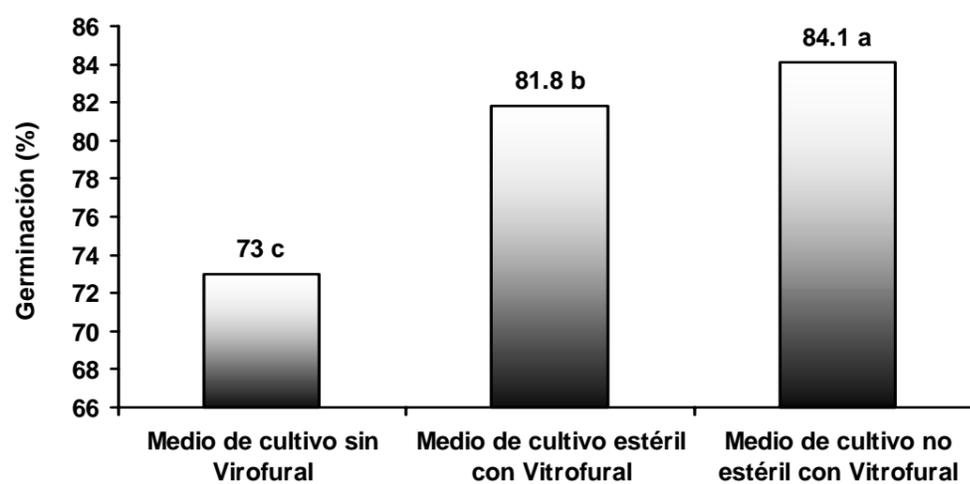
| | |
|---------|-----------|
| MG ± EE | 8.3 ± 0.6 |
| CV | 7.2 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

Figura 7. Influencia de la dosis de Vitrofuroral sobre la germinación de los embriones somáticos desnudos de caña de azúcar en la tercera semana de cultivo.



Al comparar la frecuencia de germinación de los embriones somáticos de aquellos tratamientos donde se aplicó Vitrofurul (figura 8) con los embriones cultivados en medio de cultivo *sin vitrofurul* (control) se puede observar, que la frecuencia de germinación fue mayor en aquellos tratamientos donde se aplicó este producto, con un 84.1% en el medio de cultivo esterilizado con Vitrofurul, lo cual, puede tener su explicación en que al no efectuarse el autoclaveo se suprime el efecto negativo del calor sobre el medio de cultivo, lo que hace que aumente la estabilidad de sus componentes y posibilita que los nutrientes son aprovechados en mayor medida. Algunos autores como Hurtado (1987), han hecho referencia al efecto negativo del autoclaveo sobre la estabilidad química de los ingredientes de los medios de cultivo, señalando como efectos más comunes la degradación de los azúcares, aminoácidos, reducción de la calidad de los agentes gelificantes, así como la disminución del pH.



| | |
|---------|------------|
| MG ± EE | 7.96 ± 1.6 |
| CV | 13.1 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan

Figura 8. Efecto de la forma de aplicación del Vitrofurul al medio de cultivo semisólido sobre la frecuencia de germinación de los embriones somáticos de caña de azúcar en la tercera semana de cultivo.



Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos por Agramonte *et al.* (1997) durante la esterilización química de los medios de cultivo empleados en la micropropagación *in vitro* de la papa, caña, banano y piña, los cuales obtuvieron que esta sustancia química fue capaz de controlar los posibles contaminantes microbianos. Estos mismos autores señalan que en todos aquellos tratamientos donde se aplicó el Vitrofuroral los resultados fueron superiores al control *sin vitrofuroral*, lo cual según ellos puede estar ocasionado, por la influencia del grupo nitro que presenta este compuesto.

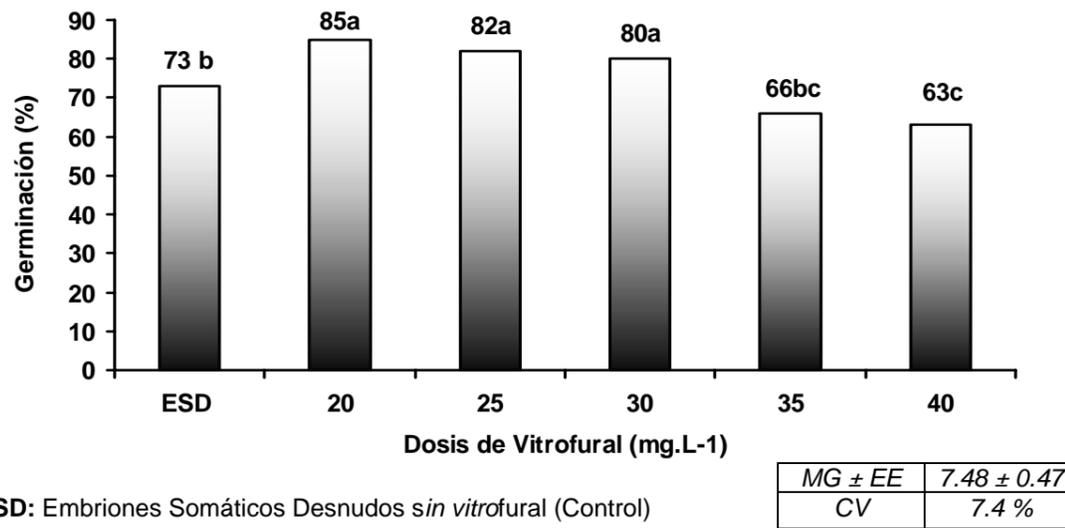
4.2.1. Influencia del Vitrofuroral sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

El Vitrofuroral evitó el ataque de agente microbianos a la cápsula, ya que no se encontró contaminación en ninguno de los tratamientos. En el endospermo sintético se pudo emplear hasta 30 mg.L⁻¹ (85 – 80%) sin que se afectara el porcentaje de germinación. Cuando la concentración de Vitrofuroral en el endospermo fueronsuperior a 30 mg.L⁻¹ los valores de germinación disminuyen significativamente, (66 y 63%) para las concentraciones de 35 y 40 mg.L⁻¹ respectivamente, con resultados inferiores a los tratamientos con embriones somáticos desnudos *sin vitrofuroral* (73%) (figura 9).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los embriones somáticos desnudos del experimento anterior, donde a diferencia de los embriones somáticos encapsulados a partir de 25 mg.L⁻¹ hay afectación de la germinación, se puede plantear que estas diferencias, pueden tener su causa fundamental en que la matriz formada por el alginato de sodio es altamente permeable y el Vitrofuroral difunde hacia el CaCl₂ a medida que ocurre el proceso de acomplejamiento, todo parece indicar que la concentración del Vitrofuroral en la cápsula disminuye a medida que transcurre el tiempo de reacción en CaCl₂, lo cual se manifiesta en la coloración amarilla (típica del Vitrofuroral) que toma el CaCl₂ (solución incolora) después de



finalizado el proceso, con lo cual la concentración final del vitrofural en la cápsula es menor a la añadida inicialmente.



ESD: Embriones Somáticos Desnudos *sin vitrofural* (Control)

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan

Figura 9. Influencia de la dosis de Vitrofur sobre la germinación *in vitro* de los embriones somáticos encapsulados en la tercera semana de cultivo.

Diversos autores como Molle *et al.*, (1993) recomiendan para la protección química de la cápsula otros compuestos químicos como el benomyl o carbendazim, porque no son tóxicos en dosis bajas ($1 - 5 \text{ mg.L}^{-1}$), pero tienen como inconveniente que no logran controlar todos los géneros de hongos; en el caso de los antibióticos señalan que las cefalosporinas no son tóxicos y algunas veces estimulan el crecimiento, pero son extremadamente caros.

Bapat, 1993 destaca el efecto protector del benomyl aplicado en el endospermo sintético de yemas de mora, así mismo Vilariño *et al.* (1996) señalan el efecto protector y estimulador del crecimiento del benomyl en yemas encapsuladas de papa. Aunque se debe destacar que estos compuestos no han logrado el efecto obtenido con el Vitrofur.



Según los resultados obtenidos, se puede concluir, que el Vitrofural puede ser empleado eficientemente en la esterilización química y protección del endospermo sintético de caña de azúcar, ya que no solo fue capaz de controlar los contaminantes, sino que la aplicación de este producto trajo consigo una serie de ventajas como fue la reducción de la concentración de alginato de sodio en un 33.0% y facilitó el proceso de encapsulación el cual se pudo realizar en condiciones no estériles, a partir de este momento se empleó para la encapsulación 2% de alginato sin autoclavar con un tiempo de reacción en CaCl_2 de 15 minutos y la extracción y encapsulación de los embriones somáticos se realizó a partir de este momento en condiciones no estériles. Se debe señalar además, que el Vitrofural es un producto nacional obtenido a partir de los furfuralos de la caña de azúcar por lo que su precio es menor que algunos productos químicos clásicos que se han empleado en el cultivo de tejidos.

Además del Vitrofural de la cápsula pueden estar escapando por difusión otros elementos como nutrientes, hormonas y vitaminas que son importantes en el endospermo sintético.

4.3. Influencia de la inmersión de las cápsulas en KNO_3 sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados.

4.3.1. Estudio de diferentes tiempos de inmersión en KNO_3 .

Según los resultados obtenidos la inmersión de las cápsulas durante una, dos, tres y cuatro horas no influyeron significativamente sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados, obteniéndose diferencias significativas con respecto al tratamiento sin inmersión en KNO_3 solo cuando estos fueron inmersos durante cinco horas, con valores de germinación similares a los embriones somáticos desnudos, por lo se puede decir, que la inmersión de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar durante cinco horas en KNO_3 fue beneficiosa y mejoró las condiciones de la cápsula (tabla 1).



Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en KNO_3 sobre la germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar a las tres semanas de cultivo.

| Tiempo de inmersión en KNO_3 (horas). | No. de ES promedio germinados por frasco a los 15 días. | Porcentaje de germinación. |
|--|---|----------------------------|
| Embriones desnudos. | 4.2 a | 84 |
| TEE (sin sumergir). | 2.6 c | 52 |
| 1 h | 2.8 c | 56 |
| 2 h | 2.8 c | 56 |
| 3 h | 2.8 c | 56 |
| 4 h | 3.0 bc | 60 |
| 5 h | 4.0 ab | 80 |

| | |
|-------|----------|
| MG±EE | 3.5±0.37 |
| CV: | 10.5 % |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Duncan.

Algunos autores como Sakamoto *et al.* (1995), plantean que durante la inmersión de las cápsulas de alginato de calcio en KNO_3 el ión Ca^{2+} es sustituido parcialmente por el K^+ formando enlaces iónicos débiles lo cual hace el enrejado más frágil y propenso a la ruptura. Estos mismo autores describen como se produjo el autorrompimiento de las cápsulas de zanahoria cuando estas fueron inmersas en una solución 200 mM de KNO_3 durante una hora.

Ramamoorthy y Ramanujan, (1993) señalan que para mejorar la estructura de la cápsula en ápices encapsulados de caña de azúcar desarrollaron un procedimiento donde las cápsulas una vez endurecidas en cloruro de calcio son enjuagadas con agua corriente estéril y después son



sumergidas en una solución de nitrato de potasio, seguido de otro enjuague con agua corriente, este tratamiento puede ser aplicado al propágulo antes o después del proceso de recubrimiento.

Como inconveniente se debe señalar, que las plantas obtenidas en el tratamiento con cinco horas manifestaron tamaño pequeño y una coloración verde claro, lo cual puede estar asociado a la falta de nutrientes en la cápsula, debido a la excesiva permeabilidad de la matriz de alginato de calcio la cual deja difundir a través de ella elementos internos trayendo consigo la pérdida de nutrientes y al largo tiempo de exposición a la solución de KNO_3 . Según Redenbaugh, (1993) una de las grandes desventajas de la matriz de alginato de sodio es su excesiva permeabilidad.

Algunos autores como Tapia *et al.* (1998) comprobaron a través de técnicas de HPLC como la mayor parte de la sacarosa y el AG_3 difunden rápidamente hacia el exterior de las cápsulas en las primeras 24 horas después de confeccionadas, lo que se corroboró en el experimento con Vitrofur al donde se observó un cambio de coloración en la solución de CaCl_2 debido a la difusión de este compuesto y que indica que junto con el Vitrofur al también difunden otros componentes del endospermo sintético.

Teniendo en cuenta que producto a la pérdida por difusión de los nutrientes de las cápsulas durante el largo período de inmersión en KNO_3 las plantas obtenidas tenían un tamaño muy pequeño se decidió buscar la forma de enriquecer la solución de nitrato para evitar o disminuir este flujo de nutrientes hacia el exterior de la cápsula, dando lugar al siguiente experimento.

4.3.2. Efecto de la forma de aplicación del KNO_3 .

Los mejores resultados se obtuvieron (tabla 2) con el tratamiento D donde las cápsulas fueron goteadas en cloruro de calcio sin medio de cultivo y posteriormente sumergidas en KNO_3



disuelto en medio de cultivo durante cinco horas (76% de germinación). Aunque los resultados de este tratamiento no difirieron significativamente con el tratamiento (B) donde no se añadió medio de cultivo al KNO_3 (72%) se debe destacar, que en este último las plantas obtenidas brotaban de las cápsulas pero a penas crecieron, mientras que en el tratamiento D las plantas obtenidas alcanzaron un tamaño normal. Esto indica que los nutrientes que difunden de la cápsula durante la reacción de acomplejamiento son reintegrados a la cápsula cuando esta es inmersa en el KNO_3 combinado con el medio de cultivo.

Tabla 2. Efecto del KNO_3 combinado con medio de cultivo en la germinación *in vitro* de los embriones somáticos en la segunda semana de cultivo.

| Tratamientos | No de Embriones germinados por frasco | Porcentaje de germinación |
|--|---------------------------------------|---------------------------|
| Embriones Somáticos desnudos | 4.2 a | 84 |
| A- Cápsulas goteadas en CaCl_2 + agua | 3.2 bc | 64 |
| B- Cápsulas goteadas en CaCl_2 + agua, sumergidas 5 h en KNO_3 + agua. | 3.6 b | 72 |
| C- Cápsulas goteadas en CaCl_2 + Medio de cultivo | 2.8 c | 56 |
| D- Cápsulas goteadas en CaCl_2 + agua, inmersas 5 h en KNO_3 + Medio de cultivo. | 3.8 ab | 76 |
| E- Cápsulas goteadas en CaCl_2 + Medio de cultivo e inmersas 5 h en KNO_3 + agua | 3.0 c | 60 |
| F- Cápsulas goteadas en CaCl_2 + MS, sumergidas 5 h en KNO_3 + Medio de cultivo. | 3.0 c | 60 |

| | |
|-------|---------|
| MG±EE | 3.4±0.2 |
| | 0 |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Duncan



La adición de medio de cultivo a la solución de CaCl_2 no benefició la germinación de los embriones somáticos encapsulados ya que los porcentajes de germinación disminuyeron significativamente cuando las cápsulas fueron inmersas en el CaCl_2 disuelto en medio de cultivo y posteriormente sumergidas en KNO_3 también disuelto en medio de cultivo (tratamiento F) (60%), así como en el tratamiento E, donde se sumergieron las cápsulas en CaCl_2 disuelto en medio de cultivo y sin inmersión en KNO_3 (58% de germinación). La adición de nutrientes (medio de cultivo) en la solución acomplejante no resultó efectiva para evitar la deficiencia de nutrientes en la cápsula, lo que puede estar motivado por el corto tiempo de la reacción o por otros factores propios del proceso de endurecimiento del hidrogel.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de los diferentes factores que influyen en la germinación de los embriones somáticos encapsulados, nos permitió definir el siguiente protocolo de encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (figura 8).

4.4. Plantación de los embriones somáticos encapsulados en condiciones de área de aclimatización.

Se logró la adaptación de los embriones encapsulados en condiciones de área de aclimatización aunque los resultados difieren notablemente de los obtenidos en condiciones *in vitro*, lográndose un porcentaje conversión de 25.09 % en siembra directa (foto 4) y solo se logró un alto porcentaje de conversión (90 - 99%) cuando las cápsulas son prebrotadas *in vitro* durante 7 – 10 días y alcanzan un tamaño de 1.5 – 2.0 cm de altura antes del transplante a la fase de aclimatización (foto 5).



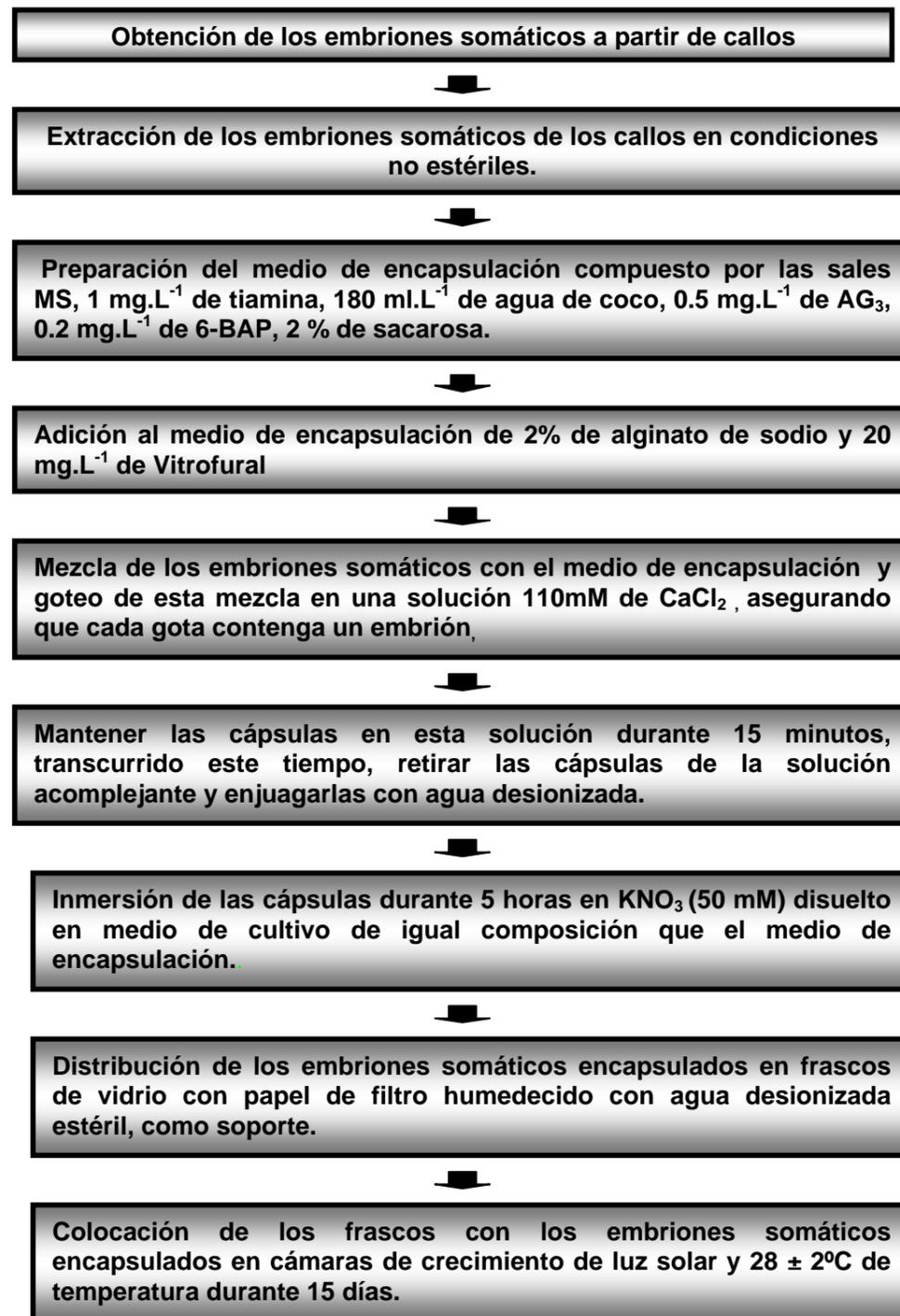


Figura 10. Protocolo de encapsulación de embriones somáticos de *Saccharum spp* Híbrido obtenidos a partir de callos.





Foto 4. Embrión somático encapsulado plantado sobre sustrato (85 % de casting + 15 % de zeolita) en condiciones de aclimatización.



Foto 5. Embrión somático encapsulado pregerminado *in vitro* antes de la plantación en área de aclimatización.

Las condiciones ambientales constituyen uno de los factores que más afectan la germinación de las cápsulas. Redenbaugh *et al.*(1987) obtuvieron porcentajes de germinación *in vitro* en

cultivos como la alfalfa y apio entre un 30.0 - 65.0%, sin embargo la frecuencia de conversión disminuyó entre un 7.0 - 10.0% cuando estas fueron trasplantadas.

Fujii *et al.* (1989) probaron varios ambientes para la adaptación a suelo de semillas sintéticas de alfalfa y no observaron diferencias en la germinación entre las cámaras de crecimiento y el invernadero, pero las plantas producidas en este último presentaron un crecimiento más vigoroso. A nivel de invernadero estudiaron varios métodos de irrigación, logrando porcentajes de germinación (36%), superiores a las cámaras de crecimiento con el empleo de aspersores (25%) y cámaras de humedad (21%). Estos autores concluyen que el escalado para la producción de trasplantes utilizando semillas sintéticas puede realizarse en invernaderos, donde se puede mantener una elevada humedad con el empleo de nebulizadores (foggers) u otro tipo de riego fino.

El paso más crítico en la tecnología de la semilla sintética es la formación de plantas a partir de brotes o embriones encapsulados bajo condiciones no estériles. Este presupone la creación de condiciones ambientales similares a las que existen en el microambiente *in vitro*, por lo que para elevar los niveles de conversión de plantas de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar se hace necesario estudiar y definir factores como el régimen de riego, humedad relativa, temperatura, luz y sustrato más adecuado para la plantación. El lavado de los nutrientes es otro de los factores que limitan la obtención de mayores porcentajes de germinación y conversión, por lo que la aplicación de técnicas como la microencapsulación podrían resolver o minimizar esta dificultad, por otro lado la calidad del embrión es el factor que limita de manera más marcada la conversión de los embriones somáticos, por lo que el empleo de embriones somáticos obtenidos en medios líquidos (biorreactores) constituye un requisito indispensable para elevar los porcentajes de conversión en plantas.



A partir de estas experiencias en el año 1998 se produjeron 6000 plantas de embriones encapsulados, las cuales fueron trasplantadas a bancos de semillas de las provincias Villa Clara y Sancti Spiritus.

4.5. Evaluación en campo de plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados.

En este experimento se corrobora la influencia del sistema de regeneración sobre las distintas variables evaluadas. Claramente se manifestó que a pesar de que el cultivo *in vitro* en general aumentó el número de tallos, las plantas procedentes de embriones somáticos encapsulados, presentan diferencias significativas con respecto a las plantas micropropagadas y el testigo de estacas, lo que indica que el sistema de regeneración utilizado también tiene su influencia sobre el posterior desempeño de las plantas en campo (tabla 3).

Tabla 3. Evaluación en condiciones de campo de plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar.

| Tratamientos | Altura (cm) | Diámetro (mm) | Número de tallos/m | Peso del tallo (Kg) | Brix |
|--------------------------|----------------|------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| Estacas | 300.0 c | 27.0 a | 16.0 c | 1.59 a | 21.6 a |
| Plantas Micropropagadas. | 317.0 b | 25.6 b | 23.0 b | 1.49 b | 21.5 a |
| Embriones Encapsulados | 356.0 a | 25.3 b | 28.5 a | 1.62 a | 21.8 a |
| MG±EE | 324±5.6 | 25.9±0.4 | 22.5±1.8 | 1.56±0.03 | 21.6±0.1 |

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan.

Los incrementos en la altura, el peso del tallo y el número de tallos en el tratamiento con embriones somáticos encapsulados fue significativamente mayor que en las plantas micropropagadas y el tratamiento con estacas, en cuanto al diámetro del tallo el comportamiento fue diferente, las plantas procedentes de estacas mostraron un grosor del tallo mayor a este fue significativamente menor en comparación con el testigo de estacas.



Hasta el momento solo Jiménez, (1995) describe el comportamiento en campo de plantas procedentes de embriones somáticos en caña de azúcar con respecto a las plantas micropropagadas y a plantas propagadas por estacas, el mismo señala que las plantas regeneradas de embriones somáticos presentaron un comportamiento similar al de las plantas micropropagadas vía yemas axilares, caracterizado por un incremento en el número de tallos.

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.

La no presencia de variantes somaclonales en este experimento puede tener su explicación en dos causas: el genotipo utilizado y el sistema de regeneración. En el primer caso por lo planteado anteriormente sobre el efecto del genotipo en la estabilidad genética de las plantas regeneradas y respecto al sistema de regeneración, la metodología de embriogénesis somática a partir de callos desarrollada en el presente trabajo utiliza bajas concentraciones de 2,4-D y solamente tres subcultivos en forma de callo con la presencia de esta hormona, lo que reduce la posibilidad de cambios debido al efecto del medio de cultivo y la edad *in vitro*.

La forma de regeneración tiene un efecto directo sobre la variabilidad somaclonal. Scowcroft (1984) clasificó los sistemas de regeneración de forma ascendente, en cuanto a la variabilidad, de la forma siguiente: micropropagación vía yemas axilares, yemas adventicias, callos embriogénicos y organogénicos, suspensiones celulares y protoplastos. Enfoque éste en el que coinciden la mayoría de los autores, y plantean además que está muy relacionado con el grado de desdiferenciación de las distintas formas de regeneración y los métodos de cultivo. Por tanto, en la propagación *in vitro* deben establecerse los medios y condiciones de cultivo para minimizar los riesgos de variación somaclonal (Pérez, 1992; Pérez, 1998).



Han sido realizadas diversas comparaciones en cuanto a la variabilidad producida por los sistemas de regeneración. En caña de azúcar Lourens y Martin (1987) compararon plantas regeneradas de yemas axilares y de callos organogénicos, encontrando 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 incluye 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 menor en la siguiente generación. Pérez (1989) también reporta 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.

Bonnel y Rosques (1988) compararon los cambios morfológicos y fisiológicos provocados por el cultivo de callos y yemas axilares en tres variedades y plantean que no hubo variaciones genéticas discernibles y que la variación somaclonal y clonal fueron de la misma magnitud.

En la caña de azúcar se ha observado que también existen variaciones en cuanto al rendimiento de las plantas propagadas *in vitro*, estas alteraciones 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). No obstante, se ha 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.



Conclusiones

5. Conclusiones.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

1. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó inicialmente la concentración de 3.0% de alginato con 15 minutos de reacción en CaCl_2 como la más adecuada para encapsulación de los embriones somáticos.
2. La adición al endospermo sintético de agua de coco (180 mL.L^{-1}) y de los reguladores del crecimiento AG_3 (0.5 mg.L^{-1}) y 6-BAP (0.2 mg.L^{-1}) permitió incrementar la germinación *in vitro* de los embriones encapsulados y reducir el tiempo de germinación (de tres a dos semanas).
3. El tratamiento de inmersión de las cápsulas en 50 mM de KNO_3 disuelto en medio de cultivo (igual composición que el medio de encapsulación) durante cinco horas permitió alcanzar un 76% de germinación *in vitro* de los embriones somáticos encapsulados en un período de 15 días.
4. El Vitrofurax (30 mg.L^{-1}) puede ser empleado en la esterilización química del endospermo sintético de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar lo cual permitió reducir la concentración de alginato de sodio de 3 a 2% y realizar todas las operaciones en condiciones no estériles, simplificándose el proceso de encapsulación.
5. Se definió un protocolo según se muestra en la figura 8, para la encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar.
6. Se logró la aclimatización de embriones somáticos encapsulados en condiciones de área de adaptación con porcentajes de conversión 25.09% en siembra directa y de 90 – 99% cuando estas fueron prebrotadas *in vitro* durante 7 - 10 días.
7. En las plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados el aumento en el número de tallos fue mayor que en las plantas micropropagadas, estas mostraron características similares a las plantas propagadas vía yemas axilares, mayor número de tallos y reducción en el diámetro, sin diferencias en el contenido de brix con respecto a las plantas de estacas.



Recomendaciones

6. Recomendaciones.

1. Emplear el protocolo desarrollado para la encapsulación de embriones somáticos encapsulados obtenidos a partir de medio de cultivo semisólido.
2. Aumentar la calidad del material a encapsular mediante el empleo de embriones somáticos obtenidos a partir de medios líquidos (biorreactores o agitador orbital) como requisito fundamental para elevar los porcentajes de germinación y conversión de los embriones somáticos encapsulados.
3. Probar la aplicación de otras técnicas que puedan mejorar el endospermo sintético y evaluar el efecto protectante a mediano y corto plazo de otros agentes químicos y biológicos para garantizar la sanidad de las cápsulas en condiciones *ex vitro*.
4. Determinar el manejo óptimo de las condiciones ambientales para elevar los porcentajes de conversión en la fase de aclimatización.
5. Extender los ensayos *in vitro* y en condiciones de campo un mayor número de variedades para estudiar el efecto del genotipo en la estabilidad genética según los protocolos de regeneración desarrollados.



Bibliografía

7. Bibliografía.

- Accart, F.; Monod, V.; Potssonier, M.; Dereuddre, J.; Paques, M. 1994. Cryoconservation of *Papulus alba x tremula* shoot tips in vitro cultured. Abstracts VIIIth International congress of Plant Cell and Tissue Culture (Firenze, Italy). p. 51.
- Aftab, F.; Zafar, Y.; Malik, K. A.; Iqbal, J. 1996. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplast in sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrid cv. Col-54). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44, pp. 71-78.
- Agramonte, D. 1999. Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum L.*) var Desirée. Tesis de Doctorado. p 91.
- Agramonte, D.; Jiménez, F. A.; Pérez, M.; Gutiérrez, O.; Ramírez, D.; Pérez, J.; Alvarado, Y.; Castañedo, N.; Díaz, G.; Martín, E. L.; Salazar, E. y Machado, R. 1997. Empleo de sustancias de acción antimicrobianas en la esterilización de los medios de cultivo en la micropropagación *in vitro* de la papa (*Solanum tuberosum L.*). En: Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas BIOVEG'97. Libro de Resúmenes. Ciego de Ávila, Cuba. p. 121.
- Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M.A.L. 1995. In: Automation and Environmental Control in Plant Tissue culture, edited by J. Aitken-Christie, T. Kozai and M.A.L. Smith (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. xi –xii.
- Antonietta, G. M.; Piccioni, E.; Alvaro, S. 1999. Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 55, pp. 235 – 237.
- Attree, S. M.; Pomeroy, M. K.; Fowke, L. C. 1995. Development of white spruce (*Picea Galuca* (Moech) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. Journal Experiment Botany. Vol. 46 (285), pp. 433 – 439.

- Ballester, A.; Janeiro, L. V.; Veitez, A. M. 1997. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoots tips of *Camelia japonica* L. and *Camelia reticulata* Lindley. Science Horticulture. 71, pp. 67 – 68.
- Bapat, V.A. y P.S. Rao, 1988. Sandalwood plantlets from synthetic seed. Plant Cell Rep. 7, p. 434.
- Bapat, V.A. y P.S. Rao, 1990. *In vivo* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). Plan Cell Tissue and Organ Culture. 30, pp. 69 – 70.
- Bapat, V.A. 1993. Studies on synthetic seed of sandalwood (*Santalum album* L.). En: Redenbaugh, K (Ed), Synseeds. Application of Synthetic Seed to Crop Improvement. CRC Press. p. 382-406.
- Barcelló, J., Barcelló, J.; Rodrigo, N. G.; Sabater, B.; Sánchez, R. 1995. Mecanismo de acción hormonal. En : Fisiología Vegetal. Barcelló, J.; Rodrigo, N. G.; Sabater, B.; Sánchez, R (eds). Ediciones Pirámides, Madrid. pp. 375 – 402.
- Bazinet, C.; Dürr, c.; Richard, G.; Barbotin, J. N. 1996. Growth conditions influence regeneration of encapsulated carrot somatic embryos into plantlets. Biotechnology Techniques. Vol. 10 (12), pp. 983 – 986.
- Bonnel, E. y Rosques, D. 1988. Somaclonal and clonal variabilities in sugar cane (*Saccharum sp.*) Comm 3e Congr. Assoc. Riun. Dev Tech. Agric. Sucri: 313-325. S.C.(1) 1990, p. 31.
- Brisibe, E.; Miyake, H.; Taniguchi, T.; Maeda, E. 1994. Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). New Phytol. 126, pp. 301 – 307.
- Capuano, E.; Piccioni, E.; Standardi, A. 1998. Effect of different treatments on the conversion of M-26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 73 (3), pp. 299 – 305.

- Carlson, W. C y Hartle, J.E. 1995. Manufactures seeds of woody plants. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Volume I-History, Molecular and Biochemical Aspects, and Applications, (eds) S. M. Jain; R. K. Gupta and R.J. Newton (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). pp. 253 – 263.
- Castillo, B.; Smith, M. A.; Yadava, U. L. 1998. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Report. 17, pp 172 – 176.
- Comstock, J. 1989. Micropropagation plantlet: laboratory production, nursery operations and field aspects. In: Creativity Commitment Cooperation tools for Advancement. Hawaiian Sugar Technologists 47th Ann. Conf. Rpt. Honolulu. pp. 38-39.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. In: The New York Botanical Garden. p. 55.
- Deng, M. L.; Wang, Z. Y. ; Li, X. Q. 1990. A preliminary studies on artificial seeds of wheat. In: Studies on Artificial Seeds of Plant, Peking University Press, Beijing. pp. 56 – 83.
- Dix, L. y Van Staden, J. 1982. Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. Plant Cell Tissue and Organ Culture (1), pp. 239-245.
- Falcinelli, M.; Piccioni, E.; Standardi, A. 1997. Il seme sintetico nelle piante agrarie: stato attuale della ricerca. Sementi. Elette. 43, pp. 9 – 17.
- Falco, M. C.; Januzzi, B. M.; Tulmann, A. 1996b. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. R. Bras. Fisiol. Veg. 8 (1), pp. 1 – 6.
- Florin, B.; Tesserau, H.; Lecoutex, C.; Didier, C.; Petiard, V. 1993. Long-term reservation of somatic embryos. In: Redenbaugh, K. (ed). Synseeds: applications to crop improvement. Boca Raton: CRC Press. pp. 62 – 133.
- Flynn, L.I. y Anderlini, T.A., 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, p. 113.

- Freire, M.; Gómez, R.; Herrera, I.; Reyez, M. 1999. Embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum sp* Híbrido) empleando medios líquidos. En: Libro de reportes cortos: V Coloquio Internacional Biotecnología de Las Plantas. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba. pp. 118 – 119.
- Fujii, J.A.; Slade, D.; Redenbaugh, K. 1989. Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seeds, *In vitro* Cell. Dev. Biol. 25, p. 1179.
- Fujii J.A., Slade, D.; Redenbaugh, K.; Walker, K.A. 1992. Field planting of alfalfa artificial seeds. *In vitro* Cell Dev. Biol. 28, pp. 73-76.
- Ganapathi, T. R.; Suprasanna, P.; Bapat, V. A.; Rao, P. S. 1992. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. *Plant. Cell Rep.* 11, pp. 571 – 575.
- Gardi, T.; Piccioni, E.; Standardi, A. 1999. Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species. *J. Microencapsulation.* 16 (1), pp. 13 – 25.
- Garret , E., J. J. Mehlschau., N. E. Smith y K. Redenbaugh, 1991. Gel encapsulation of tomato. *Am. Soc. of Agricultural Engineers.* 7, p. 1.
- George, L. y Eapen, S. 1995. Encapsulation of somatic embryos of finger miller (*Eleusine corocana* Gaertn). *Ind. J. Expt. Biol.* 33, pp. 291 – 293.
- Gnanapragasan, S y Vasil, I. K. 1990. Plant regeneration from cryopreserved embryogenic cell suspension of commercial sugarcane hybrid (*Saccharum sp.*). *Plant Cell Reports.* 9, pp. 419 – 423.
- Gómez, R., 1996. Selección in vitro a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea Syd*) de la caña de azúcar (*Saccharum sp Híbrido*). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. Cuba. p. 98.

- Gómez, R.; Escalant, J. V.; Reyez, M.; Posada, L.; Freire, M. 1998. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en dos clones de banano (Musa AAA Cv Gran Enano y Musa AAAB Cv FHIA-18). Libro resumen. REDBIO'98. La Habana, Cuba. pp. 43 – 44.
- Grassl, C. O. 1974. The origin of the sugarcane. ISSCT Sugarcane Breed. Newsl. 34, pp. 10 – 18.
- Gray, D. J. y Purohit, A. 1991. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. CRC Press, Ins. Critical Reviews in Plant Sciences. 10 (1), pp. 33 – 6.
- Gray, D. J.; Compton, M. E.; Harrell, R. C.; Cantliffe, D. J. 1995. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Crit. Rev. Plant. Sci. 10, pp. 33 – 61.
- Guiderdoni, E. 1986 a. L'Embryogenese somatique des explants foliaires de canne a'sucre (*Saccharum spp*) cultivés in vitro. Etude anatomique de la morphogenese. L'AgronomieTropicale. 41, pp. 160 – 165.
- Guiderdoni, E.; Demarly, Y. 1988. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 14, pp. 71 – 88.
- Gutman, M.; Von Anderkas.; Label, P.; Lelu, A. 1996. Effects of abscisic acid on somatic embryos maturation of hybrid larch. Journal Experimental Botany. 47 (305), pp. 1905 – 1917.
- Guiderdoni, E.; Mérot, B.; Eksomtramage, T.; Paulet, F.; Feldmann, P. 1995. somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum spp*). In: Y.P.S. Bajaj (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 31. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Springer-Verlag. pp. 92 – 113.
- Heinz, D.J.; Mee, G.W.P. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop Sci. (9), pp. 346-348.
- Ho, W. Y Vasil, I. K. 1983 a. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). The morphology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma. 118, pp. 169 – 180.

- Hurtado, M. D. 1987. Cultivo de tejidos Vegetales. Marino, M. Editorial Trillas, Abril. pp. 5 – 8.
- Janeiro, V. L.; Ballester, A.; Vieitez, M. 1997. In vitro response of encapsulated somatic embryos of camelia. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51, pp. 119 – 125.
- Janick, J., K. Yong-Hwan, S. Kitto, y Y. Saranga. 1993. Desiccated Synthetic Seed. En: Redenbaugh, K (ed). *Synseeds. Application of Synthetic Seed to Crop Improvement*. CRC Press. pp. 11-34.
- Jiménez, E y Quiala. 1998. Semilla Artificial. En: j. N. Pérez (ed). *Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 225 – 240.
- Jiménez, E., 1995. *Propagación in vitro de la caña de azúcar (Saccharum spp híbrido)*. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. Cuba. p.93.
- Khor, E.; NG.; Loh, C. S. 1998. Two-coat systems for encapsulation of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds and protocorms. *Biotechnology and Bioengineering*. 59 (5), pp. 635 – 639.
- Kitto, S. y J. Janick. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. *HortScience*, 17 (113), pp. 448.
- Komamine, A. 1998. Mecanismos de la embryogenesis somática. Aspectos morfológicos, fisiológicos y Biología molecular. Conferencia Magistral. REDBIO'98. La Habana, Cuba.
- Kozai, T.; Ting, K. C.; Aitken-Christie, J. 1991. Considerations for automation of micropropagation systems. *Transactions of the ASAE*. 35, pp. 303 - 158.
- Krishnaraj, S.; Vasil, I. K. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: T. A. Thorpe (ed). *In vitro embryogenesis in plant. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic Publishers. Vol. 20, pp. 417 – 469.
- Krikorian, D. A. 1993. Medios de cultivo, generalidades, composición y preparación. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentación y Aplicaciones*. pp. 41 – 77.

- Lee, T. S. G. 1987. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum spp*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 10, pp. 47.
- Li, X. Q. 1989. Establishment of the basic preparation process of artificial seed of carrot. Acta Bot. Sin. 31 (9). p. 673.
- Liu, M. C. 1993. Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of callus from culture immature inflorescences of sugarcane. J. Plant Physiol. 141, pp. 714 – 720.
- Lourens, A.G.; Martin, F.A. 1987. Evaluation of in vitro propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. Crops Science (27), pp. 793 – 796.
- Lu, X., T. Zhang, M. L. Deng, X. Q. Li. 1990. Absorption and desorption of nutrient by activated charcoal in the preparation of carrot artificial seed, in studies on Artificial Seeds of Plants, Peking University Press Beijing. p. 31.
- Makunthakumar, S y Mathur, A. K. 1992. Artificial seed production in the maile bamboo (*Dendrocalamus strictus* L.). Plant Sci. 87, pp. 109 – 113.
- Marhidharan, E. M. y Mascarenhas, A. F. 1995. Somatic embryogenesis in Eucalyptus. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants (eds) Jain S, Gupta, P & Newton, R. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol. 2-Angiosperms. pp. 23 – 40.
- Maruyama, E., I. Kinoshita, K. Ishii, H. Shigenaga, K. Ohba y A. Saito, 1997. Alginate encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrela Odorata* L., *Guasuma critina* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. Sivaie Genetica. 46, p. 1.
- Marzolais, A.; Wilson, D. P. M.; Tseyita, M. J.; Senaratna, T. 1991. somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. Can. J. Bot. 68, pp. 1188 – 1193.
- Matsumoto, K.; hirao, C. O.; Teixeira, J. 1995. In vitro growth of encapsulated shoots tips of banana (*Musa sp*). Acta Hortic. 370, pp. 13 – 17.

- Matsuoka, M.; Teraychi, T.; Kobayashi, M.; Nakano, Y. 1995. Plant regeneration from suspension cultures in sugarcane (*Saccharum spp*). Plant tissue culture Letters. 12 (2), pp. 193 – 195.
- Mckersie, B. D. y Brown. 1996. Synthetic seeds of alfalfa. In: Redenbaugh, K (ed). Synseeds: Application of synthetic seed to crop improvement. pp. 231 – 255.
- Michelli, M.; Mencuccini, M.; Standardi, A. 1998. Encapsulation of “in vitro” proliferated buds of olive. Adv Hortib. 370, pp. 13 – 17.
- Molle, F., J.M. Dupuis, J.P. Ducos, A. Anselm, I. Crolus-Savidan, V. Petiard y G. Freyssinet, 1993. Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. En: Redenbaugh, K (Ed.), Synseeds. Application of Synthetic Seed to Crop Improvement. CRC Press. pp. 257 – 287.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15, pp. 473 – 497.
- Murashige, T. 1977. Plant cell cultures as horticultural practices. Acta Hort. 78, pp. 17-21
- Nieves, N.; Lorenzo, J. C.; Blanco, M. A.; González, J.; Peralta, H.; Hernández, M.; Santos, R.; Concepción, O.; Borroto, C.; Borroto, E.; Tapia, R.; Martínez.; Fundora, Z.; González, A. 1998. Artificial endosperm of *Cleopatra tangerine* zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 54, pp. 77 – 83.
- Nomura K. y Komamine, A. 1995. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis by proline and serin. In: T. A. Thorpe (ed). In vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers. pp. 249 – 265.
- Onishi, N., Y. Sakamoto y T. Hirosawa, 1994. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39, pp. 137-145.

- Pattnaik , S. K y Chan, P. K . 1996. Artificial seed as an aid to clone white mulberry. Abstract of the International Workshop and Bioencapsulation V, Potsdam, Germany, September, 23 – 25. pp.165 – 168.
- Payán, A.; Carmen, H.; Tascón, G. 1977. Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) mediante el cultivo de tejidos y yemas. Acta Agronómica (Columbia). 37, pp. 43 – 79.
- Pérez, J. 1989. Die Nutzung der in vitro Kultur und die Induktion von Mutationen bei der Zucht von Zuckerrohr (*Saccharum* spp.) Leipzig, Univ. Institut für tropische Landwirtschaft. Disertación para el grado de Doctor B. Alemania. p. 99.
- Pérez, J. 1992. Variación somaclonal. Primer curso FAO- Francia -Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara. pp. 285 – 295.
- Pérez, J. N. 1998. Variación somaclonal. En: J. N. Pérez (ed). Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 105 – 121.
- Peros, J.P.; Bonnel, E. 1990. Utilisations de la culture in vitro de la canne à sucre en pathologie: cas de la striure, de la gommose et de la rouille. L'Agronomie Tropicale. pp. 4 – 44.
- Piccioni, E. y Standardi, A. 1995. Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 42, pp. 221 – 226.
- Piccioni, E.; Standardi, A.; Tutuianu, V. C. 1996. Storage of M. 26 apple rootstock encapsulated microcuttings. Advances in Horticultural Sciences. 10, pp. 185 – 190.
- Piccioni, E y Standardi, A. 1997. Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M. 26 apple rootstock. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 47, pp. 255 – 260.
- Piccioni, E. 1997. Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47, pp. 255 – 260.

- Quiala, E. 1995. Encapsulación de embriones somáticos de café (*Coffea arabica cv catimor*) Trabajo de Diploma. Universidad Central de Las Villas. p. 67.
- Ramanujam, K. y T. Ramamoorthy, 1993. Investigation on bud encapsulation in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Sugarcane. 1, p. 3.
- Rao, P. S., T. R. Ganapathi, P. Suprasanna y V. A. Bapat, 1993. Encapsulated shoot tips of banana: a new propagation and delivery system. INFOMUSA. December 2 (12), pp. 4 – 5.
- Redenbaugh, K., J. Nichol, M. E. Kossler y B. Paasch, 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In vitro Cell*. 20, pp. 256.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P., Fujii, J.A. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience*. 22, pp. 803-807.
- Redenbaugh K., 1990. Application of artificial seed to tropical crops. *HortScience* 25, pp. 251.
- Redenbaugh, K.; Fujii, J.; Slade, D.; Viss, P.; Kossler, M. 1991. Artificial seeds – encapsulated embryos. In: Bajaj, Y.P.S. (ed). *High-technology and Micropropagation I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag. Berlín. 17. pp. 395 – 416.
- Redenbaugh K., J. A. Fujii, D. Slade. 1993. Hydrated coating for synthetic seed. In: *Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement*. K. Redenbaugh (ed). California. pp. 34 - 45.
- Repunte, V. P.; Taya, M.; Tone, S. 1995. Preparation of artificial seeds using cell aggregates from horseradish hairy roots encapsulated in alginate gel with paraffin coat. *J. Ferment Bioeng*. 79, pp. 83 – 86.
- Roberts, D., Webster, F.; Flinn, B.; Lazaroff, R.; Dyr, C. 1993. Somatic embryogenesis of spruce. En: Redenbaugh, K. (ed). *Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC Press. p. 427-452.
- Sakamoto, Y., M. Hayashi y A. Okamoto. 1993. Celery and lettuce. In: *Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement*, ed. K. Redenbaugh. California. pp. 306 - 326.

- Sakamoto, Y.; Noboru, O. and T. Hirose, 1995. Delivery systems for tissue culture by encapsulation. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Ed: Yenny Aitken-Christie, Tokoyi Kozai, Mary Ann Lila Smith. pp. 215 – 243.
- Sanada M, Y. Sakamoto, M. Hayashi, T. Mashiko, A. Okamoto y N. Onishi, 1993. Celery and Lettuce. En: Redenbaugh, K. (Ed). Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement. CRC Press. pp. 305 – 328.
- Scrowcroft, W. R. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germoplasm conservation and utilization. IBPGR Report. pp. 184 – 152.
- Senaratna, T.; McKersie, B.; Bowley, S. 1990. Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Induction of Desiccation tolerance in somatic embryo. In Vitro Cell Dev Biol. 16, pp. 85.
- Senaratna, T.; Kott, L.; Beversdorf, W. D.; McKersie, B. D. 1991. Desiccation of microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Reports. 10, pp. 342 – 344.
- Senaratna, T. 1992. Artificial Seeds. Biotech Ado. 10, pp. 379 – 392.
- Senaratna, T y McKersie, B. D. 1990. Artificial seeds of alfalfa. Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. In Vitro Cell and Develop Biol. 26, pp. 85 – 90.
- Shigeta, J.; Mori, T.; Toda, K.; Ohtake, H. 1990. Effect of capsule hardness on germination frequency of encapsulated somatic embryos of carrot immobilized in calcium alginate; artificial seed germination, Biotechnol. Tech. pp. 4 – 21.
- Shigeta, J. 1995. Germination and growth of encapsulated somatic embryos of carrot for mass propagation. Biotechnology Techniques. 9 (10), pp. 771 – 776.
- Standardi, A.; Micheli, M.; Piccioni, E. 1995. Incapsulamento in alginato de espianti micropropagati. Italus. Hortus. 2, pp. 32 – 46.
- Standardi, A. y Piccioni, E. 1996. Rooting induction in encapsulated buds of M. 26 rootstock for synthetic seed. Second International Symposium on the Biology of root formation and development. Jerusalem, Israel. Abstracts. p. 10.

- Standardi, A. y Piccioni, E. 1998. Recent perspectives on the synthetic seed technology using nonembryogenic in vitro-derived explants. *In Vitro Cell Dev Biol.* pp. 12 - 16
- Suprasanna, P.; Ganapathi, T. R.; Rao, P. S. 1996. Artificial seed in rice (*Oryza sativa* L.): encapsulation of somatic embryos from mature embryo callus culture. *Asia Pc. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4, pp. 90 – 93.
- Takahata, Y.; Brown, D. C. W.; Keller, W. A.; Kaizuma, N. 1993. Dry artificial seed and desiccation-tolerance induction in microspore-derived embryos of broccoli. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 35, pp. 121 – 129.
- Takayoshi, N.; Hayashi, Y.; Masumoto, K. 1998. Somatic embryo induction from cell suspension of *Aralia cordata* using biorreactors. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67 (1), pp. 87 – 92.
- Tan, K. T.; Loon, W. S.; Khor, E.; Loh, C. S. 1998. Infection of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds by mycorrhizal fungus. *Plant Cell Report.* 18, pp. 14 – 19.
- Tang, S. H. 1996. Studies on artificial seed derived from encapsulated axillary buds of sweet vibernum (*Viburnum odoratissimum*). *In Vitro Cell.* pp. 11 – 13.
- Tapia, R.; Nieves, N.; Blanco, M.A.; Castillo, R. y A. González, 1998. Determinación de la capacidad de difusión de la matriz de alginato de sodio para la encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar. Libro de Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REBIO 98. 28.
- Tautorus, T. E y Dustan, D. I. 1995. Scale-up of embryogenic plant suspension culture in bioreactors. In: Jain, S. M.; Gupta, R. K.; Newton, R. J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants: Histology biomolecular and biochemical aspects, and application.* Kluwer , Dordrecht. 1, pp. 265 – 292.
- Taylor, P. W. J.; Hian-Lien, K.; Adkiss, S. W. 1992. Factors affecting protoplast isolation and the regeneration of shoot-like structures from protoplast-derived callus of sugarcane (*Saccharum spp* Hybrids). *Aust. J. Bot.* 40. pp. 786 – 863.

- Timber , R.; Barbotin, J. N.; Thomas, D. 1996. Effect of sole and combined pre-treatments and reserve accumulation survival and germination of encapsulated and dehydrated carrot somatic embryos. *Plant Science*. 120. pp. 223 – 231.
- Tetteroo, F. A. A.; Hoekstra, F. A.; Karsen, C. M. 1995. Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota* L.) embryoids. *J. Plant. Physiol.* 145, pp. 349 – 356.
- Tetteroo, F. A. A. 1996. Desiccation tolerance of somatic embryoids. Tesis de PhD. Universidad Agrícola de Wageningen. pp. 1 – 3.
- Uozumi, N. y Kobayashi, T. 1995. Artificial seed production through encapsulation of hairy roots and shoots tips. In: Y. P. S. Bajaj (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed I.* Springer , Berlín. 30, pp. 170 – 180.
- Vasil, I.K. 1985. Somatic embryogenesis and its consequences in gramineae. In: *Tissue Culture forestry and Agriculture*. R. Henke; K. Hughes; M. Constantin and Hollander, (eds). Plenum N.Y. p. 31 – 47.
- Vilariño S., D. Agramonte, L. Herrera, M. Pérez, Y. Alvarado y M. Acosta. 1996. La encapsulación de yemas axilares de papa. Estudio del medio de cultivo y de las condiciones para la brotación in vitro. *Rev. Centro Agrícola*. Año 23. No. 1-3. 12-1, pp. 49.
- Zhang, T. H, X. C. Lu, M. L. Deng y X. Q. Li. 1990. Studies on coats and preservatives for carrot artificial seeds. En *Studies on artificial seed of plant*. Peking University Press, Beijing. pp. 36- 41.