



ARTÍCULO/ARTICLE

Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa, *Fragaria virginiana*, utilizando ANA y BAP

Seedling regeneration of strawberry, *Fragaria virginiana*, means somatic embryogenesis using NAA and BAP

Shirley Valderrama-Alfaro, Julio Chico-Ruíz*, Jérica Tejada-Castillo y Amelia Vega-Anhuamán

Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n. Trujillo-Perú. *Autor a quien dirigir la correspondencia: jchico22@hotmail.com

RESUMEN

La fresa, *Fragaria* sp. (Rosaceae), es un fruto muy apreciado, tanto en fresco como procesado, posee el mejor mercado interno y externo, además de tener algunas ventajas competitivas más rentables por unidad y áreas respecto a otros cultivos de la costa. La adecuación de nuevas tecnologías, para el cultivo de la fresa, a nivel nacional, presenta inconvenientes por su falta de difusión y uso. Una alternativa de solución a estas limitaciones son las técnicas de cultivo "in vitro", de las cuales se puede utilizar la embriogénesis somática. Con estos antecedentes nos propusimos regenerar plántulas, a partir de hojas de fresa, vía embriogénesis somática, utilizando ANA y BAP. El medio nutritivo base fue Murashige y Skoog, 1962 (MS) a la mitad de su concentración. Se suplementó el MS con reguladores del crecimiento: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para inducir los callos, bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalénacético (ANA) para el crecimiento de los embriones y solo BAP para la germinación de los mismos utilizando 2,4-D (4,52 uM), y a los 20 días, se obtuvo el 73.34% de callos friables. Para la formación de embriones, a los 50 días, la combinación 0,54(uM) ANA y 0,44(uM) BAP fue la más favorable (72,97%). Los embriones germinaron y desarrollaron a plántula en un 61% a la concentración de 4.44uM de BAP y a los 110 días.

Palabras clave: *Fragaria virginiana*, embriogénesis somática

ABSTRACT

The strawberry, *Fragaria* sp. (Rosaceae) is a very popular fruit, both fresh and processed, has the best domestic and foreign markets, besides having some competitive advantages and more profitable per unit area compared to other crops on the coast. Adapting new technologies to the cultivation of strawberries, nationally, has disadvantages because of their lack of dissemination and use. An alternative solution to these limitations is the techniques of cultivation *in vitro* of which can be used somatic embryogenesis. With this background we set out to regenerate seedlings, from strawberry leaves, via somatic embryogenesis using NAA and BAP. The basic nutrient medium was Murashige and Skoog 1962 (MS) to half its concentration was MS supplemented with growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) to induce callus, benzylaminopurine (BAP) naphthaleneacetic acid (NAA) for growth of embryos and only BAP for germination of these. Using 2.4-D (4.52 uM), and 20 days was obtained 73.34% of friable callus. For the formation of embryos after 50 days, the combination 0.54 (uM) NAA and 0.44 (uM) BAP was the most

favorable (72.97%). The embryos germinated and developed a seedling in a 61% concentration of BAP 4.44uM and 110 days.

Key words: *Fragaria virginiana*, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

La fresa, *Fragaria* sp. (Rosaceae) es una planta de consistencia herbácea, rastrera y estolonífera. La parte comestible viene a ser el receptáculo que desarrolla en interacción con los aquenios y madura con una pulpa suave y aromática. Este fruto muy apreciado, tanto en fresco como procesado, posee el mejor mercado interno y externo, además de tener algunas ventajas competitivas más rentables por unidad y áreas respecto a otros cultivos de la costa ^{1,2}. Las variedades de fresa comercialmente importantes son: tajo, thioga, chandler, douglas y fern. La mayor parte de ellas cultivadas en Huaral (Lima), por ello los valles de esta zona presentan la más alta producción nacional (6 837 t/Ha) ¹

La adecuación de nuevas tecnologías, para el cultivo de la fresa, a nivel nacional, presenta inconvenientes por su falta de difusión y uso. Así la dificultad que afrontan los trabajos de mejoramiento convencional en esta especie, son básicamente la lentitud y altos costos, ya que se requiere entre 10 a 15 años para la creación de una nueva variedad. La presencia de virosis en estas plantas (más de 20) limita su producción, lo cual hace necesario su saneamiento para aumentar su producción, pero la costumbre de mantener los cultivos por mucho tiempo y propagarlos a partir de ellas (los cuales presentan enfermedades virósicas) y el costo de adquirir nuevas plantas o semillas, limitan superar sus niveles de productividad. Una alternativa de solución a estas limitaciones son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la cual permite una propagación clonal rápida de un gran número de plantas, de importancia económica, en un período breve de tiempo ^{1,2,3,4}

Un hecho muy particular de la utilización de la técnica "in vitro" es la inducción de embriones somáticos, es decir, inducir la formación de embriones a partir de células somáticas, sin la necesidad de fusión de gametos, caracterizándose estos por ser semejantes estructural, fisiológica y bioquímicamente a los embriones cigóticos y capaces de pasar por estadios similares. Los embriones somáticos germinan y desarrollan en plántulas completas, con tallo y raíz. ^{5,6}

En 1902, Haberlandt ⁷ propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser demostrada en aquel tiempo. Posteriormente, y en forma simultánea, Reinert (1958), Steward y col. (1958) informaron acerca de la producción de embriones somáticos (ES); más tarde se demostró que estos embriones eran originados a partir de células aisladas, demostrándose la totipotencialidad de las células vegetales.

Se presentan dos tipos diferentes de embriogénesis somática: a) **directa**, en este caso el embrión se origina directamente, a partir de una célula o tejido, sin que se produzca formación previa de callo; b) **indirecta**, primero se forma un callo a partir del cual se forman posteriormente los embriones. En este caso las células a partir de las cuales se forman los embriones, reciben el nombre de **células determinadas embriogénicas**, y produce embriones cuando son inducidas a ello. ^{6,8}

La embriogénesis somática ha sido descrita en muchas especies ⁸ y, en la mayoría de ellos se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la formación de los embriones somáticos en el callo. ⁴ El proceso de inducción y desarrollo de embriones se divide en **cuatro fases**. En la **fase O**, células individuales competentes (estado 0) forman masas embriogénicas en presencia de auxina y adquieren paulatinamente el potencial para formar embriones, dando lugar a agregados celulares en estado I. En la fase siguiente (**Fase I**), inducida cuando los agregados celulares son transferidos a un medio sin auxina, se produce una activación de la división celular (estado 2) en zonas localizadas de dichos agregados que conduce a la formación de embriones globulares (**fase II**), los cuales se desarrollan hasta plántulas (**fase III**) pasando por los estados de **corazón**, **torpedo** y **cotiledonar** ^{9,10}. Otros reguladores del crecimiento muy utilizados son las citoquininas, éstas son un componente

opcional en el medio de cultivo y, en la mayoría de los casos, favorecen la embriogénesis o incluso pueden actuar como agentes inductores cuando los explantes son muy juveniles^{9,13,14,15}

Los progresos relacionados en el proceso de embriogénesis somática y, sus posibles aplicaciones, han sido resumidos en varios trabajos^{8,11}. En estas experiencias se menciona que el explante puede ser cualquier parte del vegetal, con la condición de presentar un estado juvenil de la misma. Así, experiencias que informan haber utilizado como explante una hoja joven de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, y con 2,4-D (10 ó 25 uM), BAP (1 uM) y sacarosa (120 g/l) obtuvieron embriones somáticos, en forma directa.¹² Otra experiencia en el proceso de inducción de embriones somáticos, utilizó 2,4-D (0,25 mg/l), picloram y 0,1 mg/l de BAP y para la maduración de los mismos utilizó BAP (2 mg/l) y AIA (0,1 mg/l), a partir de hojas de *Cicer arietinum* L.¹⁶ Alta frecuencia de embriones somáticos, se obtuvo a partir de hojas de *Populus* sp. (híbrido NC-5339) aquí los callos embriogénicos fueron inducidos en la oscuridad y utilizando 2,4-D (5 mg/l) y BAP (0,05 mg/l), el desarrollo del embrión se debió a la optimización de la proporción auxina-citoquinina (5 mg/l de 2,4-D y 0,05 mg/l de zeatina).¹⁷

Experiencias realizadas con hojas de *Fragaria ananassa* obtuvieron 31 embriones somáticos por explante, para ello utilizaron TDZ (4 mg/l). El máximo porcentaje de germinación (48%) fue en el medio con K (1,0 mg/l).¹⁸; en otra experiencia también utilizaron combinación de 2,4-D (1,0 mg/l), BAP (0,5 mg/l) y 50% de prolina con altos porcentajes de cultivos con embriones somáticos.¹⁹

Con lo expuesto en párrafos anteriores, existe pues una variada bibliografía relacionada a la obtención de embriones somáticos, en todos ellos utilizando como medio inductor base, el 2,4-D. No se pudo obtener bibliografía relacionado a “fresa” sobre este tema y que nos de una idea hasta donde se puede haber avanzado con ésta técnica. Los avances en el mejoramiento y propagación masiva de plantas aplicando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales “in vitro” mediante la siembra de callos ha motivado el interés para efectuar esta investigación.

Con el objetivo de regenerar plántulas de “fresa” *Fragaria virginiana* Duch. var. tajo, procedentes de explantes de hoja utilizando como sustancias inductoras ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) es que se realizó la siguiente experiencia.

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal:

Se utilizaron plantas de fresa, *Fragaria virginiana* Duch var. tajo, de 30 días de edad, saneadas y adquiridas de la Estación Experimental Donoso (Huaral-Lima). Estas plantas fueron las donadoras de los explantes (hoja) para iniciar el trabajo experimental (Fig. 1a).

Medios de cultivo:

El medio nutritivo base fue Murashige y Skoog, 1962 (MS) a la mitad de su concentración. Se suplementó el MS con reguladores del crecimiento: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para inducir callos, bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalénacético (ANA) para el crecimiento de los embriones y BAP para la germinación de los mismos. Además todos los tratamientos tuvieron sacarosa (30 g/l), fitagel (3 g/l). La medida del pH varió entre 5.5 y 6.0

Los medios nutritivos, una vez preparados, fueron esterilizados en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Toma y siembra de la muestra:

Las hojas jóvenes de fresa hoja fueron tomados como explantes.

Una vez obtenidos los explantes, en el laboratorio se procedió a desinfectarlos con alcohol (70%) por 30 segundos e hipoclorito de sodio (2%) por 2 minutos; previo a cada paso de desinfección, los residuos de estas sustancias fueron lavados con agua destilada estéril. Todo el trabajo se realizó en la cámara de cultivo, la cual previamente había sido esterilizada con luz UV e hipoclorito de sodio (2%) teniendo la precaución de dejar los mecheros encendidos al final del trabajo de limpieza.

Los explantes una vez desinfectados, estaban listos para ser introducidos “in vitro”. En las hojas se eliminaron los bordes del limbo y el pedúnculo, luego se realizaron cortes para obtener porciones de 2,5 cm² de lado aproximadamente. Estos explantes fueron sembrados en frascos de vidrio (5 x 1 cm), que contenían el medio nutritivo (Fig. 1b).

Inducción de callos:

Se utilizó, para tal fin, el medio inductor de callos (MIC) el cual contenía 2,4-D (4,52 uM) como regulador del crecimiento. Una vez introducidos los explantes en el MIC, los frascos fueron colocados en la sala de incubación, pero en ausencia de luz. Después de 20 días, y formados los callos, fueron traspasados al medio de crecimiento de embriones (MCE). Se utilizaron 200 explantes de hoja y Se evaluó el número de callos formados por explante, color y tipo de los mismos. El diseño estadístico fue completamente al azar.

Crecimiento y maduración de los embriones somáticos:

Los callos embriogénicos obtenidos fueron seccionados para ser introducidos al medio de crecimiento de embriones (MCE) cuyos tratamientos fueron los siguientes:

ANA (uM)	BAP (uM)
0,0	0,0
0,0	0,44
0,54	0,00
0,54	0,44
0,54	4,44
5,37	0,44
5,37	4,44
26,85	4,44
5,37	22,19

Los callos introducidos fueron llevados a incubar en presencia de luz blanca, proporcionada por fluorescentes (3000 lux), con un fotoperiodo de 16:8 y a temperatura de 24° C variando esta en 2°C. Se emplearon solo callos embriogénicos 100 aproximadamente para cada tratamiento. Se evaluaron los embriones formados por explante, color y deformaciones de los mismos.

Germinación de los embriones: aproximadamente 0 callos con embriones somáticos fueron introducidos en el medio germinación de los embriones (MGE), los cuales estuvieron en los siguientes tratamientos

BAP (uM):				
0.44	2.22	4.44	8.88	35.50

Se mantuvieron las mismas condiciones de luz y temperatura que en la experiencia anterior. Se evaluó el tiempo de emergencia y número de plantas obtenidas y anomalías presentes.

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos del MIC, MCE y MGE fueron tabulados para obtener promedios, porcentajes y posterior aplicación del análisis de varianza (ANAVA), cuyos datos fueron previamente transformados (arco seno), y la prueba de Duncan con un nivel de significancia de 0,05 respectivamente.

RESULTADOS

Cuando el explante se pone en contacto con el 2,4-D, las células comienzan a dividirse muy rápido y aumentar su volumen desorganizadamente, y es así como lo vemos en la hoja de fresa (Fig. 1c,d). Pero este proceso inductivo con el tiempo va tomando un volumen, fácilmente visible, viene a ser el callo (90%, Tabla 1). Además, el tipo de callo presente es el friable (embriogénico) mucho más que el tipo compacto (Tabla 1, Fig. 1e,f). Otra característica observable es el color del callo, el cual va de un blanco, a un verde y café, predominado el callo de color blanco, que tiene todas las características de un callo embriogénico y se presenta en un 66% (Tabla 2, Fig. 2g). En la Fig.2h se observa a una célula característica de un callo de tipo compacto, con gránulos de almidón en su interior. Además, cada explante es capaz de formar 3 a 4 callos, separados y de diferente tamaño. Estos fueron seccionados para ser introducidos al MCE.

Al exponer los callos embriogénicos a MCE, los resultados observados presentan un nivel de significancia ($p < 0.05$) en relación al testigo, siendo la combinación ANA (0,54 μM) y BAP (0.44 μM) significativamente mejor (Duncan, $p < 0.05$) con 81 callos presentando embriones (72.97%). El porcentaje más bajo se observa cuando el BAP está solo (0.44 μM) (Tabla 3). En estos callos los embriones están en formación, dispersas entre las células no inducidas, presentando las formas globulares y torpedo (Fig. 2i,j). Luego crecen y maduran para emerger a través del callo y observarse en su superficie (Fig. 2g), son de un color blanco-amarillento y miden aproximadamente 1 mm. Cuando están maduros es notoria la presencia del cotiledón (Fig. 2k,l).

El proceso de hacer germinar los embriones es crítico, por el cual se obtuvo pocas plántulas (Tabla 4), pues la mayoría de los embriones murieron o germinaron en forma anormal. Sin embargo la concentración de BAP (4,44 μM) se muestra promisorio para el proceso de germinación de embriones somáticos. Las pocas plantas aclimatadas están registradas en la Fig. 3 y 4. Solo pudieron estar en este ambiente 30 días, luego murieron (Tabla 5).

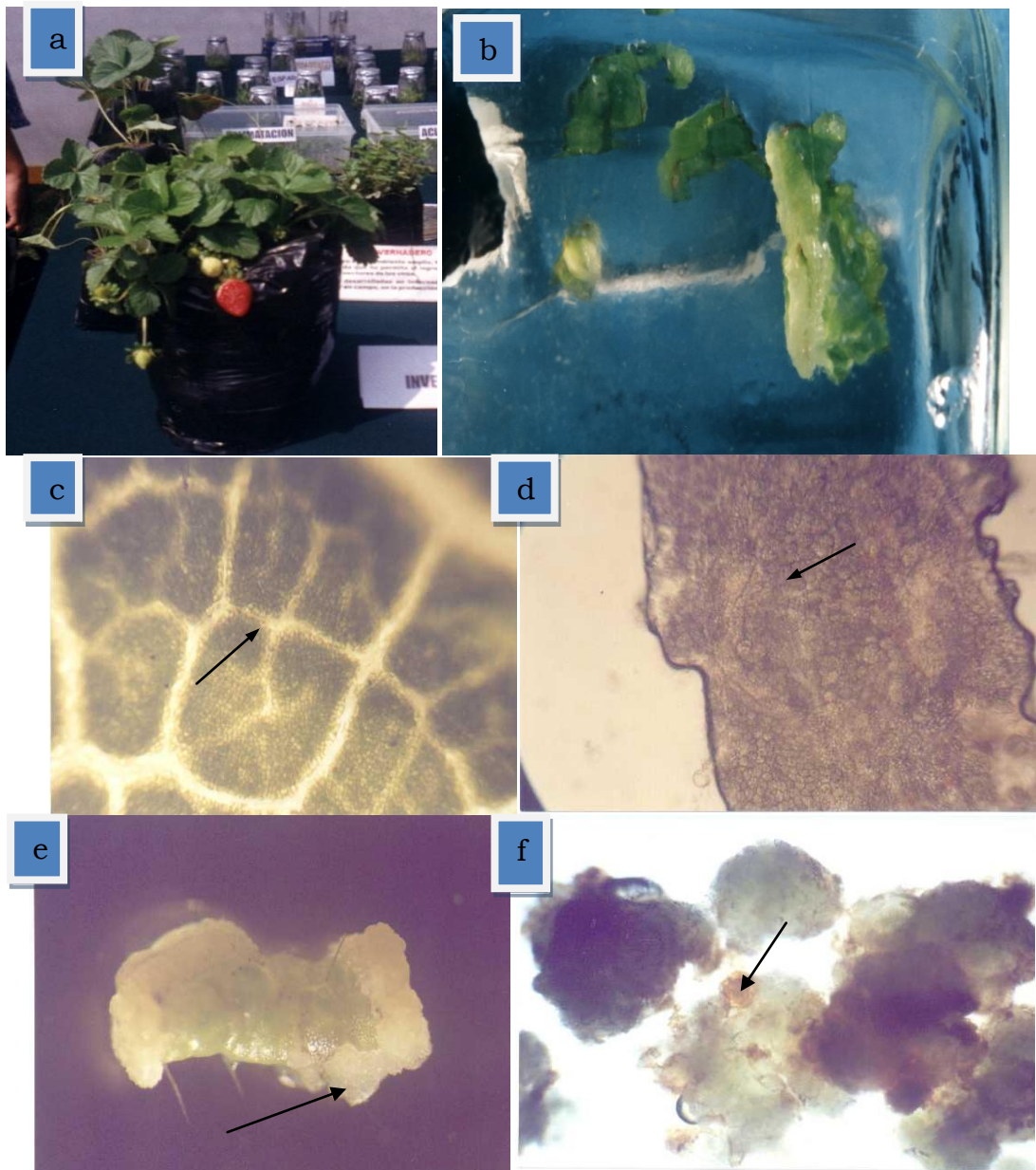


Fig. 1. Etapas para inducir callos en hojas de *Fragaria virginiana* var. tajo. (a) planta donadora de hojas (b) hoja in vitro. (c) lámina foliar con células ordenadas y nervaduras visibles (flecha). Vista superficial

400x. (d) lámina foliar con células desordenadas (flecha) por efecto del 2,4-D (4.52µM). Vista superficial 400x. (e) callo de tipo friable (embriogénico) y (f) callo de tipo compacto, a los 20 días de ser inducido con 2,4-D (4.52µM).

Tabla 1. Inducción de callos en hojas de *Fragaria virginiana* Duch. var. tajo, utilizando 2,4-D (4,52 uM), a los 20 días del cultivo “in vitro”

Explantes introducidos	Callos						Crecimiento ^a
	formados		compactos		friables		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
200	180	90	48	26.66	132	73.34	+++

^a crecimiento del callo embriogénico: + pobre; ++ moderado; +++ rápido

Tabla 2. Color de callos a los 10 y 20 días, inducidos a partir de hojas de *Fragaria virginiana* Duch. var. tajo. Se utilizó 2,4-D como sustancia inductora.

EXPLANTE (días)	HOJA					
	B		V		C	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
10	66	33	17	8,5	15	7,5
20	132	73,3	30	15,0	18	9,0

Blanco (B): callo friable, embriogénico, transparentes, de superficie lisa y redondeada, las células dispuestas ordenadamente en porciones globosas (masas embriogénicas)

Verde (V): callos de color verde y duros, con estructura desorganizada y textura rugosa.

Café (C): callo de textura rugosa, poco compacto formado por células disgregadas.

Tabla 3. Efecto de las diferentes concentraciones de ANA-BAP en la formación de embriones somáticos en *Fragaria virginiana* Duch. var. tajo. Resultados observados después de 50 días de iniciado el cultivo

ANA (uM)	BAP (uM)	Callos		Callos con embriones	Respuesta de
		Introducidos	Nº		
0,0	0,0		30	0	0
0,0	0,44		114	11	9,64*
0,54	0,0		136	67	49,26*
0,54	0,44		111	81	72,97*
0,54	4,44		114	61	53,50*
5,37	0,44		126	79	62,69*
5,37	4,44		106	64	60,37*
26,85	4,44		117	53	45,29*
5,37	22,19		88	29	36,25*

* Nivel de significancia con respecto al medio 0,0 : 0,0 , p<0,05

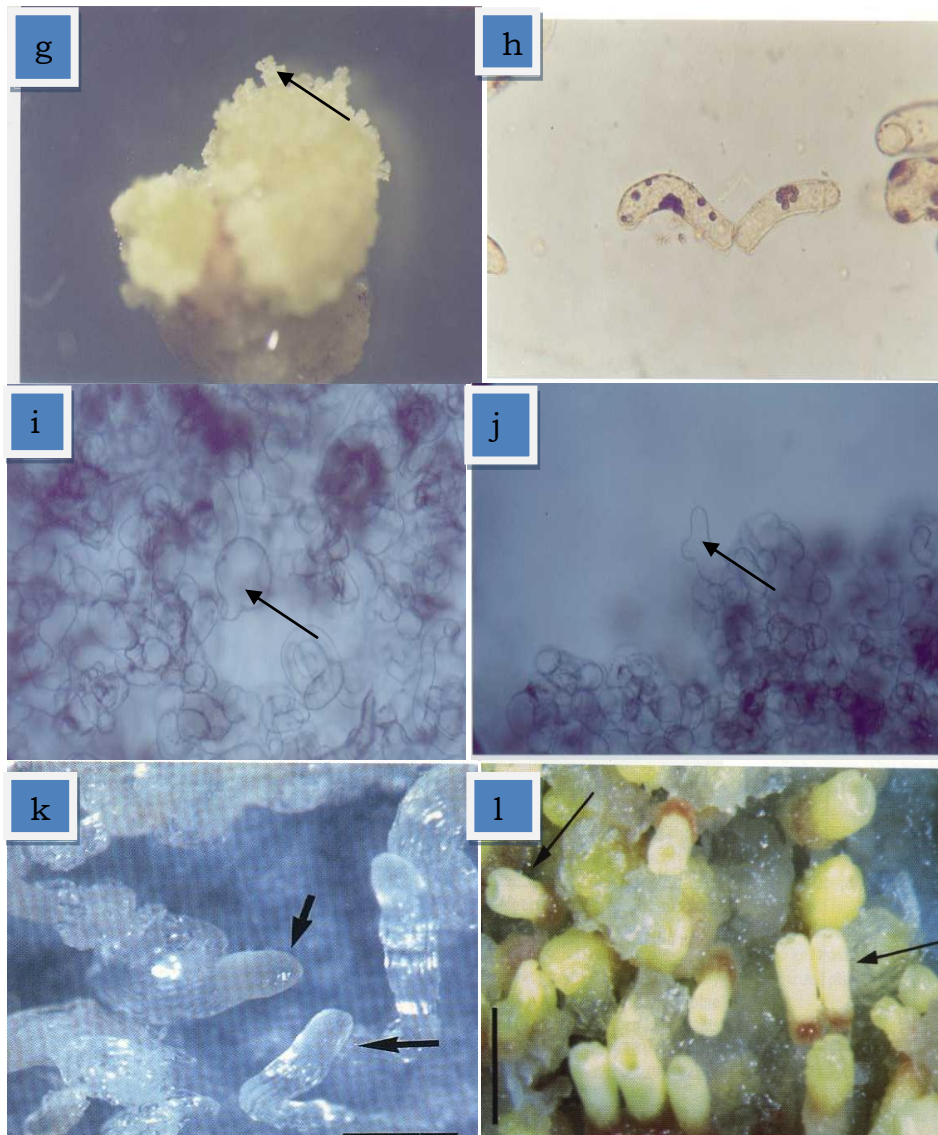


Fig. 2. Desarrollo de los embriones somáticos. (g) callo friable con embriones somáticos en su superficie (flecha). (h) células alargadas con bordes redondeados y gránulos de almidón en su interior (flecha), procedentes de un callo de tipo compacto, 400x. (i) embrión somático en su fase globular (flecha). 400x (j) embrión somático en su fase torpedo (flecha),400x. (k) embriones somático maduros en proceso de maduración (flecha), 80x. (l) embriones somáticos cotiledonares (flecha), 80x. (k y l se observaron con estereomicroscopio)

Tabla 4. Germinación de embriones de *Fragaria virginiana* Duch. var. tajo y tasa de regeneración de acuerdo a las diferentes concentraciones de BAP. Resultados observados después de 110 días de iniciado el cultivo.

BAP (uM) (P/E)x100	E	P
0,44	10	4
40		
2,22	13	1
07		
4,44	13	8
61		
8,88	07	4
57		
35,50	03	0
00		

E: número de embriones; P: número de plantas: (P/E) x 100 : porcentaje de regeneración



Fig. 3. Plántula “in vitro” de “fresa” proveniente de un embrión somático.



Fig. 4. Plántula de “fresa” en condiciones de aclimatación.

Tabla 5. Desarrollo de plántulas “in vitro” de *Fragaria virginiana* Duch var. tajo procedentes de embriones somáticos.

BAP (uM)	Normal ^b %	Anormal ^c %	Muerte %
0,44	40	10	50
2,22	07	15,3	76,7
4,44	61	00	39,0
8,88	57	00	43,0
35,50	00	33,3	66,4

^bPlántulas con ausencia de polaridad, crecen hacia abajo o en forma horizontal. ^cPlántulas con hojas y por lo menos 1 raíz.

DISCUSIÓN

La embriogénesis somática es un modelo para el estudio de los eventos morfológicos, fisiológicos, molecular es y bioquímicos que ocurren durante el desarrollo de la embriogénesis en las plantas superiores. También se aplica en la biotecnología, como en la producción de semillas artificiales, micropropagación, plantas transgénicas, etc.^{27,28} Además la expresión de embriogénesis somática depende de la especie, cultivar, y condiciones fisiológicas de la planta donadora ²⁹ balance de los reguladores del crecimiento, condiciones osmóticas, pH, concentración de aminoácidos y sales, tratamiento de calor y con varias sustancias químicas.³⁰

Cada célula mesofílica puede teóricamente, reaccionar contra las modificaciones del medio o estimula su inducción y estas señales determina una nueva polaridad vía efectos sobre las redes de los microtúbulos, la síntesis de ADN y mitosis, prerrequisitos para la inducción embriogénica ^{14,20} (Tabla 1, Fig.1d,e) esto explicaría el desorden de las células somáticos en el mesófilo de la hoja. Además el 2,4-D parece actuar como una efectiva sustancia estresante apuntando al desarrollo embriogénico en el cultivo de células vegetales.²³ Este puede regular la embriogénesis somática por una fuerte actividad auxínica, que en forma directa o indirecta, influencia en el metabolismo endógeno de las fitohormonas.²⁴ Los cambios se manifiestan

debido a que la auxina promueve divisiones longitudinales y transversales para formar pequeñas células isodiamétricas. Estas células se alargan para desarrollar las diferentes fases que llevará a la formación del embrión somático. Estos cambios frecuentemente aparecen por efecto de la composición de la pared celular y a su organización interna.^{31,32}

Además después de 5 a 7 días de tratamiento con la auxina, las células epidérmicas y corticales del explante se separan del cilindro central y en contraste a las células pro-vasculares, estas células no proliferan, de la cual intuimos que de ahí provienen las células que observamos y coincidimos cuando expresa que hay un incremento en la cantidad de citoplasma y el volumen celular decrece. Además los callos empiezan a ser más abundantes por las continuas divisiones del mesófilo (Fig. 1d). La presión, hacia fuera, por las células que se multiplican, empuja a las células que emigran por los estomas abiertos en la epidermis baja (abaxial) e interrumpe esta capa epidérmica.^{31,32,33}

En la inducción de callos, estos se presentan de dos tipos: compacto y friable. Un callo de tipo compacto es de preferencia de color verde (Fig. 1f), café, cremoso, nodular, firme y organizado, no hay espacios intercelulares a su alrededor. Este es un callo no embriogénico que puede cambiarse a uno de tipo friable. En cambio el callo de tipo friable es blanco, blando, con alta capacidad de regeneración por un largo período de tiempo, contiene numerosos embrioides globulares embebidos en una sustancia mucilaginosa (Fig. 2i), muestran una fuerte tendencia a la diferenciación y estos callos pueden transformarse en compactos o desarrollar a ES. El callo friable parece ser crucial para iniciar la suspensión embriogénica.²¹ El color del callo puede variar de acuerdo al explante y al tiempo (Tabla 2). Puede presentarse de color blanco, verde o pigmentado hasta café; es importante en algunos cultivos tomar en cuenta el color del callo, pues está en relación con el tipo de callo o la consistencia del mismo.²² Experiencias con meristemas de maíz, concluyeron que las características del callo va a estar influenciada por la edad y su capacidad de proliferación.³⁴ y que la incubación durante los primeros 20 días en oscuridad ayuda a proteger al cultivo de los daños que puedan dar los exudados fenólicos del explante seguido de una oxidación de quininas.^{18,35}

En esta experiencia se utilizaron varias concentraciones de ANA-BAP, dando como resultado la formación de embriones en todos los tratamientos pero con diferentes porcentajes (Tabla 3). La acción de las auxinas depende de su concentración y de sus interacciones con otro regulador para la formación de los embriones, y esta relación debe ser igual o mayor en algunas de ellas.²² también se debe tener en cuenta el estado fisiológico del callo primario.²⁵ Las auxinas es una de las sustancias muy usadas como agente mediador en la transición de las células embriogénicas. De 124 protocolos revisados, un 80% de ellos utiliza auxinas sola o en combinación con citoquininas y la más frecuentemente utilizada es el 2,4-D.²⁴ En la mayoría de las especies estudiadas, la adición de reguladores de crecimiento es necesario para inducir embriones somáticos y las auxinas y las citoquininas son claves en la determinación de la respuesta embriogénica, probablemente por su decisiva participación en la regulación del ciclo y división celular.²³ Además hay una relación de interacción con otras hormonas endógenas como ABA, etileno y ácido giberélico produciendo al final cambios en el desarrollo embriogénico. Estos cambios pueden ocurrir directamente (a través de síntesis de enzimas) o en forma indirecta (a través de efectores).²³ El establecimiento de la totipotencia, luego la inducción y desarrollo de los embriones somáticos requiere una reprogramación de los cultivos y esto debido a nueva síntesis de moléculas de ARN.²⁶

Se ha observado un efecto desfavorable, quizás por el cultivo prolongado, sobre la capacidad de regeneración de las plántulas con características normales (Tabla 4 y 5). Al respecto se observó que la baja formación de plántulas estaba asociada con una reducción en el acúmulo de carbohidratos de reserva, o en caso de cítricos, a una disminución en los niveles de almidón de las células, por causa del cultivo prolongado.²⁷ Ahora la falta de polaridad en el embrión desnudo sea porque presumiblemente se haya lastimado la raíz. Es conocido que la remoción de la cubierta de la raíz disminuye la respuesta a la gravedad en la mayoría de las especies²⁰, de ahí la presencia de plantas anormales y muertas. En la maduración del embrión hay cambios morfológicos y bioquímicos con evidente deposición de materiales de almacenamiento represión de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación²³

Hay varios ejemplos en la literatura en la cual los embriones no desarrollan normalmente, no germinan y no se convierten en plántulas. En otros casos el desarrollo y maduración del embrión

se interrumpe por una germinación precoz, lo cual lleva a un desarrollo pobre de la planta.²³ Las anomalías en la formación de los cotiledones están asociados con un número de desigualdades y estructuras irregulares. Así en *Vitis vinífera* se observó que la presencia de un simple cotiledón no tiene efecto en el establecimiento y desarrollo de las plántulas. Se sugiere que la “perfecta morfología” del embrión somático no debe ser estrictamente necesaria para la germinación o para la habilidad de convertirse en planta. Sin embargo hay casos que embriones somáticos con cotiledones medianos y pequeños tiene alta frecuencia de conversión en plántulas en relación a los que tienen grandes cotiledones, pero éstos pueden sobrevivir y producir plántulas vigorosas.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un alto porcentaje de callos embriogénicos (73.34%) utilizando hojas de fresa
- La combinación ANA (0,54 uM) y BAP (0,44 uM) es la más apropiada para producir el mayor número de embriones (72.97%).
- Los embriones somáticos germinaron favorablemente en la concentración de BAP (4,44 uM) en un 61 %.

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). El cultivo de la fresa. Boletín Técnico No 8. Lima-Perú. 1987.
2. Escobedo J. Fruticultura General. Lima –Perú. 1995
3. Garcia G, Ramírez Q, Munguía L. Biotecnología Alimentaria. México: Limusa S.A. 1993
4. Mendoza E. Agrobiotecnología. México: Grupo Edit. Iberoamérica S.A. 1994.
5. Hurtado D, Merino M. Cultivo de Tejidos Vegetales. México: Edit. Trillas, S.A. 1994.
6. Pierik RLM. Cultivo “in vitro” de las plantas superiores. España: Ediciones Mundi-Prensa. 1990.
7. Roca WM, Mroginski LA. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia. 1991.
8. Endress R. Plant Cell Biotechnology. Alemania: Springer-Verlag. 1994.
9. Azcon-Bieto J, Talon M. Fisiología y Bioquímica Vegetal. España: Mcgraw-Hill Interamericana. 1993.
10. Mejía A.R. Cultivo in vitro de plantas de papa. Manual de Laboratorio. INIPA. Lima-Perú. 1987.
11. Torpe T. Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. London: Academic Press, INC LTD. 1978.
12. **Bespalhok F,JC, Minoru JH, Estevos LCV. Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. Rev. Bras. Fisol. Veg. 1993; 5(1):51-53**
13. Blanckaert A, Belingheri L, Hilbert JL, Vasseur J. Detection of acidic extracellular lipid transfer protein during somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. PLANT SCIENCES 1997; 3o Colloque SFPV: 104-105
14. Blervacq AS, Dubois T, Dubois J, Vasseur J. First divisions of somatic embryogenesis cells in *Cichorium* hybrid “474”. Protoplasma 1995 ; 186:163-168
15. Medero V, Padrón E. Regeneración por embriogénesis somática en clones cubanos de yuca. Agrotec Cuba 1997 ; 27(1):5-12
16. Dineshkumar V, Kirti PB, Sachan JKS, Chopra VL. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.)plant science 1995; 109: 207-213
17. Michler Ch, Bauer E. High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* spp. Plant Science 1991; 77:111-118.
18. Amjad M, Aquill HS, Bhat B, Qadri T, Kamaluddin L, Abdin AM. A High-Efficiency Direct Somatic Embryogenesis System for Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Cultivar Chandler J Crop Sci Biotech 2008; 11 (2) : 107 - 100
19. Manosh KB, Islam R, Hossain M. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus cultura Plant Cell Tiss Organ Cult 2007; 90:49-54
20. Haggman HM, Aronen TS, Stomp AM. Early-flowering scots pine through tissue culture for accelerating tree breeding. Theor Appl Genet 1996; 93:840-848.

21. Buiteveld J, Fransr PF, Creemers-Molenaar J. Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.) Plant Science 1994; 100:195-202
22. Andrango B, Ortega UNA. Embriogénesis somática y metodología de desinfección en papa *Solanum tuberosum* L. var. "María". Quito-Ecuador. Rumipamba 1992; IX (2):1-21
23. Jiménez V. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis Plant Growth Regulation 47:91-110
24. Jiménez, V, Thomas C. Participation of Plant Hormones in Determination and Progression of Somatic Embryogenesis Plant Cell Monogr (2) A. Mujib · J. "Samaj: Somatic Embryogenesis. Berlin: Springer-Verlag. 2005.
25. Anzidei M, Bennici A, Schiff S, Tani C, Mori B. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observation of developing embryogenic callus. Plant Cell Tiss Organ Cult 2000; 61:69-79
26. Thomas C, Jiménez V. Mode of Action of Plant Hormones and Plant Growth Regulators During Induction of Somatic Embryogenesis: Molecular Aspects Plant Cell Monogr (2) A. Mujib · J. "Samaj: Somatic Embryogenesis. Berlin: Springer-Verlag. 2005.
27. Quiróz-Figueroa F, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas V. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants Plant Cell Tiss Organ Cult 2006; 86:285-301
28. Chico-Ruíz J, Cerna-Rebaza L, García-Zare M. Producción de semillas sintéticas utilizando explantes no-embriogénicos. REBIOL 2006; 26(1-2):4-15
29. Jiménez JM, Guevara E. Regeneración in vitro mediante embriogénesis somática de variedades de cítrico. II. Efecto del "plateo" de suspensiones celulares en medio de cultivo con diferentes carbohidratos sobre la inducción de embriones. Agron Costarricense 1996; 20(1):9-16
30. Parameswari N. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis Plant Cell Tiss Organ Cult 2007; 90:1-8
31. Wang TL, Cuming A. Embryogenesis. The generation of a plant. Oxford, UK: Bios Scientific Publish Lmt. 1996.
32. Chico-Ruíz J, López-Medina E, Cerna-Rebaza L, Condemarín-Montealegre C, Vargas-Aliaga C, García-Zare M. Morfología de callos embriogénicos inducidos a partir de hojas de *Vitis vinifera* var. italia, utilizando reguladores del crecimiento. REBIOL 2005; 25(1-2): 49-57
33. Laparra H, Bronner R, Hahne G. Histological análisis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heisser. Protoplasma 1997; 196:1-11
34. Torne JM, Santos MA. The meristematic cell of maize a maintenance system of tissue juvenility plant aging. In: Rodríguez et al (eds), Basic and Appical. Approaches. New York, NY: Plenum Press. 1990
35. Barwalw UB, Kerns HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 1986; 167:473-481