

# La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal

C. Celestino, I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio\*

*Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín.  
Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)*

---

## Resumen

Para dar sentido agronómico a diferentes biotecnologías de aplicación, esto es, para poder transferir las posibilidades que ofrecen a la actividad operativa, es necesario disponer de una técnica fiable de regeneración de plantas. El cultivo de tejidos de genotipos valiosos, de meristemos libres de virus, de células transformadas, etc., no sirve de nada desde un punto de vista aplicado si de ellos no es posible conseguir la multiplicación en masa de dichos genotipos selectos, obtener plantas saneadas o lograr plantas transgénicas, en condiciones económicamente viables. La embriogénesis somática está ampliamente considerada como la mejor vía de regeneración que utiliza las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en biotecnología forestal. Los avances actuales en biotecnología-genómica están teniendo un gran impacto en el uso de material selecto en muchos programas de mejora. La embriogénesis somática está contribuyendo a la producción de plantas transgénicas y a la consecución de la silvicultura clonal de alta productividad, con calidad de madera mejorada y menor impacto de enfermedades, en plantaciones forestales. Este artículo revisa la situación actual de la embriogénesis somática aplicada a especies forestales.

**Palabras clave:** Regeneración de plantas, cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

## Summary

### Somatic embryogenesis as a main tool in forest biotechnology

To give agronomic value, that is, to be able to transfer the benefits of different biotechnologies of application to operational purposes, a reliable plant regeneration technique is needed. Tissue culture of valuable genotypes, of virus-free meristems, of transformed cells, etc., is not worth if we are not able to mass propagating clonal plants, to obtain healthy plants or to achieve transgenic plants. Somatic embryogenesis is widely assumed to be the best tissue culture-based way of regenerating plants in forest biotechnology. Recent advances in biotechnology-genomics are having an important effect on the deployment of selected genetic plant materials in many breeding programs. Somatic embryogenesis is contributing to the release of transformed plants and to the implementation of clonal forestry with improved productivity, enhanced wood quality and reduced diseases in forest plantations. This article review the current status of somatic embryogenesis applied to forest species.

**Key words:** Plant regeneration, *In vitro* plant tissue culture.

---

«Somatic embryogenesis has yet to become a mature technology. Research on it is critical - and notable for its omission from your program. You may not consider this glamorous, but if you don't help recognize and foster research interest in this area by explicitly including it in your main program at such a prestigious meeting, there will be no outlet for forest biotech products. There will not

even be the ability to prove their efficacy and safety on a scale considered meaningful by most geneticists. So I am hoping you can add this to your program and thereby solicit contributions. Thank you.»

Mensaje abierto de Roger Timmis, PhD [Senior Scientific Advisor. Forest Genetics and Biotechnology R & D. Weyerhaeuser Company. USA] a los organizadores del IUFRO Tree Biotechnology 2005 Meeting. Pretoria, South Africa (7 - 11 November 2005)

---

\* Autor para la correspondencia: mariano.toribio@madrid.org  
Recibido: 04-07-05; Aceptado: 16-07-05.

A José Alberto Pardos y Jan Bonga, nuestros maestros.

## Introducción

El incremento en la población mundial es considerable: las previsiones indican que hacia la mitad del siglo XXI habrá 10.000 millones de personas, habiéndose duplicado la población en sólo sesenta años (Laarman y Sedjo, 1992). Además, el mayor incremento en la población se está produciendo en los países en vías de desarrollo, que consecuentemente habrán de incrementar su nivel de calidad de vida lo que conlleva una gran demanda de productos naturales. La creciente demanda de productos forestales, unida al incremento en la necesidad de tierras arables para satisfacer las necesidades de la agricultura en muchas partes del mundo, están llevando a una presión intensa y en aumento sobre los recursos naturales del monte. Las previsiones sobre necesidades de madera a nivel global para el año 2010 son de 500 millones de m<sup>3</sup>, un 30% más que las que se demandaron en 1994 (Pâques, 1999). Las previsiones para la mitad de este siglo son de seis billones de m<sup>3</sup> (Sutton, 2000). Esta fuerte presión de la demanda está llevando a un serio problema de deforestación, especialmente de bosques tropicales: entre 1960 y 1990 se perdieron 450 millones de ha, alcanzando la tasa de deforestación en la última década del siglo pasado casi 17 millones de ha/año (Pâques, 1999). Este es el caso del bosque Tesso Nilo en Sumatra, considerado como uno de los lugares con mayor índice de biodiversidad del mundo, que en los últimos 20 años ha perdido 300.000 ha, un 64% de su superficie, tal y como lo han denunciado diversas organizaciones internacionales como WWF (EL PAÍS, 14 de abril de 2003).

En los últimos años, tanto el reciclado de papel como el establecimiento de plantaciones forestales intensivas que puedan dar respuesta a las necesidades crecientes de madera y otros productos, se están considerando como la mejor defensa de los ecosistemas amenazados de deforestación (Sutton, 1999). Por otra parte, las plantaciones forestales están incluidas en uno de los mecanismos del Protocolo de Kyoto sobre control del calentamiento global y cambio climático, como sumideros de CO<sub>2</sub>. Recientemente, en la cumbre de las Naciones Unidas sobre el clima celebrada en Milán, se han aprobado las reglas sobre plantaciones forestales, que incluso incluyen la utilización de árboles genéticamente modificados (EL PAÍS, 11 de diciembre de 2003). Algunos países ya han comenzado los ensayos, como Australia que está financiando un programa para establecer en Vietnam una plantación de 8.000 ha de aca-

cias y eucaliptos transgénicos, siguiendo los pasos de China que estableció en 2002 la primera plantación comercial de *Populus* modificados genéticamente (FAO, 2004).

Las plantaciones han de optimizar la producción por unidad de superficie. Por ello las prácticas intensivas de mejora cultural y genética están plenamente justificadas. En relación a las segundas, la alta heterocigosidad de las especies forestales, unida al alto componente genético de tipo no aditivo que controla diversos caracteres de interés, hacen necesario acudir a la propagación vegetativa para obtener ganancias genéticas adecuadas (Zobel y Talbert, 1984). La propagación vegetativa se ha utilizado ampliamente en distintas fases de los programas de conservación y mejora de muchas especies forestales, aplicándose incluso con fines operativos en especies de los géneros *Populus*, *Salix*, *Cryptomeria* y *Eucalyptus*. Si no se ha aplicado de forma más extensiva es debido a las características biológicas de las especies leñosas: por una parte las capacidades morfogénicas, necesarias para poder efectuar esta forma de propagación, son limitadas en muchas de ellas, y por otra los problemas derivados del cambio de fase que hacen difícil o imposible la propagación de árboles adultos, por pérdida absoluta de su capacidad morfogénica. A medida que se han refinado las técnicas, en los países forestalmente más avanzados ya se está implantando de forma progresiva la selvicultura clonal de alto valor, combinada con una gestión adecuada de la variabilidad, para su aplicación a las plantaciones intensivas (Park *et al.*, 1998; Park, 2002).

Para lograr la propagación vegetativa se ha de disponer de una vía de regeneración de plantas («ramets») a partir de células, tejidos o porciones de la planta donante («ortet») que sea fiable, reproducible, aplicable a distintos genotipos, y altamente productiva. También se requiere que genere material fiel al donante sin variabilidad intraclonal y, fundamentalmente para el sector forestal, que sea susceptible de automatización para reducir los costes de producción. Al comienzo del siglo XX Haberlandt predijo que si todas las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial, el cigoto, sería posible una «marcha atrás» en su expresión génica, de tal forma que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico hasta formar auténticos embriones de origen somático. Esta posibilidad se verificó en células del parénquima de raíz de zanahoria a finales de los años 50, y desde entonces se ha ampliado a cientos de especies diferentes. Las pri-

meras especies forestales en las que se logró esta expresión de la «totipotencia» de sus células fueron *Santalum album* en el caso de frondosas (Rao, 1965), y *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hackman y von Arnold, 1985) y *Larix decidua* (Nagmani y Bonga, 1985) en el caso de coníferas. Desde entonces se han publicado miles de artículos y se han regenerado cientos de especies forestales por embriogénesis somática. Esta vía de regeneración consiste, por tanto, en la obtención de auténticas semillas somáticas, que tienen su origen en células somáticas de la planta donante, las cuales se «reprograman» y siguen un patrón de desarrollo idéntico al del embrión de origen cigótico. Al no ser la célula inicial producto de un proceso de recombinación y fusión de gametos, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante. Actualmente, la vía de regeneración que cumple con los requisitos que se mencionaron anteriormente para lograr una óptima propagación vegetativa, y que por tanto se considera como la más adecuada para la micropropagación de especies forestales, es la embriogénesis somática (Merkle y Dean, 2000; Sutton, 2002).

La regeneración de plantas a partir de células o tejidos se puede considerar como el elemento central de la biotecnología vegetal: es lo que da sentido agronómico a otras facetas de la biología celular o molecular. Disponer de una herramienta que permita regenerar plantas es imprescindible para que la clonación, el saneamiento de plantas, la crioconservación de material vegetal o la transformación genética se conviertan en biotecnologías de aplicación. Adicionalmente a su papel central en la micropropagación de especies forestales, la embriogénesis somática también se ha revelado como la mejor vía de regeneración en crioconservación (Janeiro y col, 1996; Engelmann y col, 1997) y transformación (Peña y Séguin, 2001), siendo por ello también elemento imprescindible en los estudios de genómica funcional, a fin de validar genes relacionados con procesos determinados (Campbell y col, 2003).

Desde un punto de vista aplicado, cabe resaltar que los primeros árboles generados mediante técnicas de cultivo *in vitro* se obtuvieron en el inicio de los años 60 utilizando la vía organogénica, es decir, la inducción de yemas axilares o adventicias y su posterior enraizamiento. Sin embargo, durante estos últimos años, la industria forestal ha apostado claramente por la vía de la embriogénesis somática, ya que presenta las ventajas reseñadas de su elevado potencial de multiplicación, el

potencial para hacer crecer los cultivos en biorreactores, la opción de aplicar técnicas de encapsulación para fabricar semillas sintéticas y, por último, la posibilidad de utilizar los cultivos embriogénicos como dianas adecuadas para la transformación genética. Se han publicado protocolos para la obtención de cultivos embriogénicos y su crioconservación en la mayoría de las especies forestales con interés comercial. Sin embargo, en los últimos años, los experimentos realizados mayoritariamente en empresas privadas, cuyos resultados están bajo patente, están empezando a dejar de ser accesibles (Merkle y Dean, 2000) y por ello su difusión es muy limitada. Es en estos últimos casos donde hay una mayor actividad: empresas como BioForest y GenFor (Chile), Rayonier, Rubicon y Carter-Holt Harvey (Nueva Zelanda), International Paper, Westvaco y Weyerhaeuser (USA), AFOCEL (Francia), JD Irving, Arborgen y CellFor (Canadá) están produciendo miles de brinzales clonales al año, fundamentalmente de especies tales como *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus strobus*, *Pinus elliotii*, *Pinus taeda* y *Pinus radiata* (Cyr y Klimaszewska, 2002).

## Las fases de la regeneración por embriogénesis somática

### Inducción

Es el proceso por el que las células del explanto (porción de la planta donante cultivada *in vitro*) cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos iniciales. Generalmente está condicionado por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas, pero se puede desencadenar, si el explanto es inmaduro, en ausencia de los mismos, tanto en angiospermas (Fernández-Guijarro, 1997) como en gimnospermas (Lelu *et al.*, 1999). En la mayoría de las especies la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros, lo que es sobre todo típico en coníferas (Klimaszewska y Cyr, 2002). Por ello, una de las limitaciones más importantes por el momento, es que se ha logrado en muy pocas especies la formación de embriones somáticos en tejidos procedentes de individuos adultos, y por tanto con posibilidades de ser seleccionados con fiabilidad. Para solventar este inconveniente, la estrategia que se sigue es producir líneas embriogéni-

cas a partir de semillas procedentes de cruzamientos controlados, y crioconservar las mismas mientras se evalúan algunas plantas procedentes de las mismas en diferentes lugares de ensayo. El material crioconservado mantiene todo su potencial propagativo hasta completar la fase de evaluación.

Sin embargo, paulatinamente están empezando a publicarse trabajos que indican la posibilidad de obtener embriogénesis somática a partir de tejidos no embrionarios. Así, por ejemplo, se puede inducir embriogénesis somática en hojas procedentes de plantas jóvenes de *Quercus suber* (Fernández-Guijarro *et al.*, 1994), de *Quercus rubra* (Rancillac *et al.*, 1996) y de *Quercus robur* (Cuenca *et al.*, 1999). Diferentes experimentos preliminares indicaron que se podían conseguir embriones somáticos a partir de hojas de alcornoques adultos (Fernández Guijarro, 1997; Toribio *et al.*, 2000). Recientemente se ha confirmado dicha posibilidad, clonando diferentes alcornoques seleccionados (Hernández *et al.*, 2003). Asimismo la posibilidad de lograr embriones somáticos a partir de hojas de árboles adultos se está empezando a extender a otras especies como olmo (Conde *et al.*, 2004) y roble (Toribio *et al.*, 2004), confirmando las posibilidades que abría un antiguo trabajo en encina (Féraud-Keller y Espagnac, 1989). También se puede lograr embriogénesis a partir de elementos florales (Merkle y Battle, 2000; Toribio *et al.*, 2000), pero en este caso hay que confirmar si se trata de embriogénesis somática o gamética. En algunas especies de coníferas se ha logrado la inducción de embriogénesis somática a partir de tejidos no embrionarios (Atree *et al.*, 1990; Ruaud *et al.*, 1992), pero las referencias sobre árboles adultos son todavía escasas, como la patente sobre *Pinus pinaster*, citada en Ramarosandratana *et al.* (1999), y la inducción en ápices vegetativos de árboles de 20 años en *Pinus radiata* (Smith, 1999) y de 15 años en *Pinus patula* (Malabadi y van Staden, 2005).

Uno de los aspectos fundamentales en la consecución de respuestas morfológicas es la influencia del componente genético sobre las mismas, aspecto sobre el que a menudo no se incide suficientemente en las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo se ha comprobado en varias especies, y en coníferas en particular que, fundamentalmente sobre la inducción de embriogénesis somática, existe una influencia importante del componente aditivo de la varianza genética (Park *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994), lo que permitiría efectuar una mejora genética sobre este carácter.

## Multiplicación, maduración y conversión en planta

Los embriones somáticos se multiplican por embriogénesis secundaria, lo que genera un proceso recurrente. En general, la capacidad de multiplicación clonal mediante embriogénesis recurrente es muy elevada, aparentemente ilimitada en el tiempo y libre de condicionantes estacionales, lo que proporciona un inmenso potencial multiplicativo a esta técnica. El principal cuello de botella se encuentra en la producción sincrónica de embriones de calidad, que den lugar a plantas vigorosas. Se entiende como embriones de calidad aquellos que se asemejen a los embriones cigóticos maduros de la especie.

Una vez inducida la embriogénesis somática, los embriones entran en un proceso cíclico de clonación embrionaria, que no requiere en muchos casos la presencia de reguladores del crecimiento (Fernández Guijarro *et al.*, 1995; Cuenca *et al.*, 1999). En muchas angiospermas, sobre todo cuando los embriones llegan a alcanzar un estado de diferenciación cotiledonar, este proceso de embriogénesis recurrente se suele basar en la proliferación de la caliptra del embrión somático primario que genera, tras una meristemización en múltiples zonas de su superficie, unos desarrollos embriogénicos secundarios de tipo multicelular (Puigderrajols *et al.*, 1996). Sin embargo, la embriogénesis repetitiva puede también tener lugar en otras fases del desarrollo embriogénico, considerándose la más adecuada para la proliferación en medio líquido la que tiene lugar en forma de masas preembriogénicas (PEMs) (Merkle, 1995).

El aislamiento celular es una de las hipótesis clásicas utilizadas para explicar el desencadenamiento del proceso embriogénico en células somáticas (Smith y Krikorian, 1989). Algunos autores que han observado la existencia, simultánea o no, de las vías multicelular y unicelular para la génesis de embriones secundarios han sugerido que mediante modificaciones en las condiciones de cultivo se puede favorecer una u otra vía (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992). Una posible estrategia de sincronización de cultivos es tomar material al inicio de su desarrollo embrionario, lo cual implicará potenciar la vía unicelular utilizando tratamientos que causen necrosis y/o aislamiento celular: envejecimiento de los cultivos (Féraud-Keller y Espagnac, 1989), estrés salino con macronutrientes (Choi *et al.*, 1998) y estrés no plasmolítico con sacarosa (Kamada *et al.*, 1989). También se puede utilizar la vía del aislamiento mediante

digestión enzimática de las paredes celulares, con base en la tecnología desarrollada para la obtención de protoplastos (Tibok *et al.*, 1995; Dhir *et al.*, 1998). Posteriormente, para lograr la sincronía, la técnica exige el fraccionamiento y subcultivo de las estructuras iniciales. El filtrado doble parece el más apropiado, tal y como se ha aplicado en *Liriodendron tulipifera* (Merkle *et al.*, 1990) y *Robinia pseudoacacia* (Arrillaga *et al.*, 1994).

A continuación hay que entrar a considerar el control del desarrollo estable de dichas estructuras sin embriogénesis secundaria, primero histogénesis y embriogénesis y luego maduración. Una vez obtenidos los cultivos de células aisladas o pequeños agregados en suspensión, es preciso mantener un desarrollo embriogénico estable, sin aparición de embriogénesis secundaria. En coníferas la presencia de ABA es obligada para detener la poliembrionía de partición («cleavage») y lograr que los embriones somáticos, que antes de dicho tratamiento son acúmulos globulares de unas pocas células con largas células del suspensor, lleven a cabo su proceso de histogénesis, diferenciación y maduración hasta alcanzar el estado cotiledonar (Klimaszewska y Cyr, 2002). En frondosas este regulador no ha proporcionado resultados claros, tal vez por ser muy crítico el momento de aplicación durante el proceso embriogénico. Por otra parte hay que tener en cuenta que la disminución de los niveles endógenos de dicho regulador puede ser rápida e influida por otros factores (Carrier *et al.*, 1997). También es muy generalizada la utilización, fundamentalmente en coníferas, de sustancias que disminuyen el potencial osmótico del medio y no tienen penetración celular, como el polietilén-glicol (PEG) de alto peso molecular, para estabilizar el proceso embriogénico (Yantcheva *et al.*, 1998). Asimismo, se ha señalado que la presencia de distintos tipos de azúcares, tales como fructosa (Carraway y Merkle, 1997) y maltosa (Reidiboym-Talleux *et al.*, 1998), pueden tener una influencia marcada sobre el proceso de maduración, al igual que la presencia de hidrolizado de caseína (Yantcheva *et al.*, 1998). Todas estas sustancias pueden ser determinantes en este proceso, el cual confiere a las semillas somáticas la capacidad de almacenamiento de sustancias de reserva y la resistencia a la desecación.

Se ha observado que el posible estrés causado por la ausencia de elementos nutritivos (inanición) puede ejercer un efecto regulador en el desarrollo de los embriones somáticos (Fernández-Guijarro *et al.*, 1994).

Con esta base, entre otras, funciona una técnica, la inmersión transitoria, de importante desarrollo en los últimos años. Esta técnica ha mostrado grandes posibilidades para regular el desarrollo, en medio líquido, de embriones somáticos de diferentes especies, sincronizando cultivos, impidiendo la aparición de embriogénesis secundaria y estimulando la maduración (Cabasson *et al.*, 1997; Etienne *et al.*, 1997).

Desde un punto de vista práctico, el proceso de embriogénesis recurrente en medio sólido es muy laborioso, debido a la necesidad de efectuar repicados frecuentes, aunque puede servir para producir el relativamente pequeño número de plantas que se necesitan para llevar a cabo ensayos clonales. Sin embargo, la producción de plantas clónicas por embriogénesis somática con fines operativos, tiene que pasar por el desarrollo del cultivo en medio líquido y la utilización de biorreactores. El estudio del efecto de los nutrientes sobre los explantos cultivados *in vitro* está adquiriendo, cada vez más, una importancia capital por su influencia no sólo sobre el crecimiento sino también sobre las respuestas morfológicas, hasta el punto de que en determinadas circunstancias pueden sustituir a los reguladores del crecimiento (Preece, 1995; Ramage y Williams, 2002). Por otra parte, el cultivo en medio líquido presenta indudables ventajas sobre el medio semisólido: hay una mayor disponibilidad de los nutrientes y se difunden mejor los metabolitos excretados por los tejidos. Además, debido a la ausencia de la interferencia del gelificante, se pueden medir con más facilidad y en forma continua variaciones en el pH, conductividad, iones, etc., al tiempo que se puede reemplazar por medio fresco con más facilidad. Por ello se considera como la base necesaria para establecer biorreactores en los que se pueda automatizar el cultivo. Sin embargo el cultivo en medio líquido presenta problemas como las dificultades de aireación y la inducción de fenómenos de vitrificación en los tejidos. La técnica de inmersión transitoria puede resolver dichos problemas, y constituirse en la base del desarrollo de futuros biorreactores. Además se ha comprobado, como se ha mencionado anteriormente, que diferentes frecuencias de inmersión, con el estrés ayuno-nutrición que propician, tienen también efectos de regulación morfológica, particularmente en embriogénesis somática (Etienne y Berthouly, 2002). Por ello los sistemas de cultivo en medio líquido utilizando técnicas de inmersión transitoria, se están revelando como muy útiles de cara a la promoción y el control del proceso recurrente, permitiendo el escalado de los cultivos

embriogénicos en condiciones de automatización. Las recientes experiencias con cultivos de coníferas, utilizando mallas como soportes de las masas de embriones-suspensores, abren grandes expectativas para el desarrollo de biorreactores con estas especies (Vágner *et al.*, 2005).

Por último, los embriones maduros han de germinar para lograr las plantas que se transfieran a suelo. Los mejores tratamientos para obtener germinación coordinada y sincrónica son los tratamientos de frío. Para mejorar las tasas de conversión, puede ser importante tener en cuenta el momento de la transferencia *ex vitro*, dado que en algunas especies se ha observado que la transferencia de los embriones recién germinados proporciona mejores tasas que las de plantas inicialmente desarrolladas *in vitro* (Merkle y Watson-Pauley, 1994). Para el acondicionamiento de las plantas en condiciones *in vitro*, se ha estudiado el efecto de algunos reguladores como giberelinas, así como de sustancias complejas (hidrolizado de caseína y leche de coco) (Rugkhla y Jones, 1998).

## Evaluación y aplicaciones adicionales

### Fidelidad clonal

La propagación vegetativa permite generar progenies en las que se captura todo el potencial genético, aditivo y no aditivo, del progenitor. Sin embargo, cuando aparece variabilidad intraclonal muchas de las ventajas de la propagación vegetativa se ven reducidas. Por ello, para cualquier método de propagación vegetativa que se aplique, es muy importante que se obtengan plantas en las que se mantenga la fidelidad clonal (Park *et al.*, 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, la propagación vegetativa mediante embriogénesis somática, utilizando técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, puede jugar un papel muy importante en las estrategias de mejora de especies forestales, especialmente si se puede lograr a partir de individuos adultos. Sin embargo, las técnicas de cultivo de tejidos pueden causar variación somaclonal, en parte de origen genético (Larkin y Scowcroft, 1981). También hay que considerar que la variación genética puede estar presente entre diferentes partes del árbol donante (Libby y Ahuja, 1993) y por tanto trasladarse a la progenie vegetativa. Por ello, la detección precoz de posible variación genética es de ca-

pital importancia cuando se desea mantener la fidelidad clonal.

Distintos tipos de marcadores de ADN (RAPDs, SSRs, AFLPs) pueden ser apropiados para la detección de variación precoz, pudiendo con ellos identificar a los donantes y hacer un seguimiento de su descendencia clonal. Los marcadores de tipo AFLP se han señalado como muy apropiados para diferentes estudios sobre diversidad genética, mapeo e identificación clonal. Son más adecuados que los RAPDs, particularmente por su repetibilidad y porque generan muchos más marcadores polimórficos por reacción. Esta técnica se ha utilizado para determinar la estabilidad genética de material procedente de cultivo *in vitro* (Engelborghs *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Vendrame *et al.*, 1999; Hornero *et al.*, 2001). En los últimos años, al aumentar el número de identificaciones de loci microsátélites en muchas especies, y particularmente aquellos que son suficientemente inestables como para detectar variaciones, los marcadores tipo SSR están comenzando a utilizarse para la detección de la variación somática, tanto la existente en material propagado mediante técnicas de estaquillado convencional (Lian *et al.*, 2004), como utilizando técnicas de cultivo *in vitro* (Wilhelm *et al.*, 2005).

Diversos autores han manifestado que la regeneración de plantas por embriogénesis somática es una vía menos expuesta a generar variación genética debido a que su consecución implica la expresión de muchos genes, y cualquier alteración en los mismos haría inviable el proceso (Vasil, 1995). Aunque hay diversos estudios que señalan la estabilidad genética de embriones somáticos y de las plantas por ellos generadas (Heinze y Schmidt, 1995; Gallego *et al.*, 1997; Engelborghs *et al.*, 1998), otros trabajos indican la aparición de variaciones entre embriones somáticos (Vendrame *et al.* 1999; Hornero *et al.*, 2001). Se da el caso de encontrar variación entre embriones somáticos, pero no entre las plantas obtenidas de su germinación (Wilhelm *et al.*, 2005).

### Evaluación en campo

Entre los aspectos que más preocupan a los investigadores relacionados con la embriogénesis somática, el más importante es el asociado a un distinto grado de madurez de las plantas obtenidas por propagación vegetativa respecto a las procedentes de semilla (Ruaud y Pâques, 1995). Los ensayos en campo son necesarios

para comparar el comportamiento de plantas con distintos orígenes y, asimismo, proporcionan una valiosa información en cuanto a la estimación de interacciones genotipo-ambiente y a la evaluación de clones.

En el campo forestal son pocas las especies en las que se ha conseguido la transferencia a tierra de propágulos micropropagados y, en la mayoría de los casos, estos provienen de donantes en fase juvenil en los que no es posible hacer una selección por características deseables asociadas siempre a la plena madurez de los árboles. Los ensayos en campo para evaluar el comportamiento de las plantas micropropagadas más extendidos son los realizados en especies de mayor valor comercial, pudiendo destacarse los estudios realizados en *Picea glauca* (Webster *et al.*, 1990; Grossnickle *et al.*, 1992), en *Picea abies* (Ruaud y Pâques, 1995) y en *Pseudotsuga menziesii* (Benowicz *et al.*, 2002). En angiospermas, la aplicación comercial más extendida se encuentra en la palma de aceite, *Elaeis guineensis* (Khaw *et al.*, 1998). En estos trabajos, plantas procedentes de semilla y de embriones somáticos derivados de tejidos juveniles tuvieron un desarrollo similar durante los primeros años de crecimiento, indicando estos resultados un alto grado de mantenimiento de juvenilidad en las plantas obtenidas por embriogénesis somática.

### Comparación embrión cigótico vs. somático

En muchas especies el paso más limitante para el desarrollo de la embriogénesis somática es el proceso de maduración, con la acumulación inherente de sustancias de reserva (Merkle, 1995). Por lo tanto, el estudio del proceso de maduración del embrión cigótico puede ser útil para definir un modelo que sea aplicable a la embriogénesis somática, fundamentalmente en lo que se refiere a la composición de los medios de cultivo. Esto es de especial importancia en especies como las del género *Quercus*, donde la acumulación de sustancias de reserva tiene lugar en los cotiledones y no en el endospermo o en el megagametofito, como es el caso en coníferas.

Los estudios sobre nutrición de embriones se han realizado tradicionalmente aplicando diferentes composiciones y concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento de los medios de cultivo, y evaluando su efecto mediante la determinación de parámetros sencillos, tales como la tasa de crecimiento y el número

de estructuras embriogénicas. Los resultados que se obtienen con estos ensayos carecen de una significación fisiológica, por lo que en la mayoría de los casos, no es posible conocer los mecanismos involucrados en el proceso. Más recientemente en algunos estudios se han considerado otras variables tales como los nutrientes y los cambios en la composición del embrión, lográndose mejores ajustes en la composición del medio de cultivo y un mejor control del proceso embriogénico (Montoro *et al.*, 1995; Magnaval *et al.*, 1997). Existe la posibilidad de mejorar los procesos de embriogénesis somática basándose en el conocimiento de la fisiología de cada estadio de desarrollo del embrión cigótico *in vivo*, y sobre el conocimiento de los factores de crecimiento y niveles de nutrientes observados en óvulos durante los procesos de embriogénesis cigótica (Carman *et al.*, 1996; Joy *et al.*, 1996). En este sentido Michaux-Ferrière (1998) llegó a la conclusión de que la información suministrada por el estudio del desarrollo del embrión cigótico puede mejorar la realización de sistemas de embriogénesis somática en ciertas especies.

### Crioconservación

La crioconservación es decir, el almacenamiento de material biológico a temperatura del nitrógeno líquido, es el único método actualmente disponible para asegurar la conservación a largo plazo de los recursos genéticos de especies que tienen semillas recalcitrantes o han de ser propagadas vegetativamente (Engelmann y Takagi, 2000). La conservación de células, tejidos y órganos vegetales en nitrógeno líquido permite el almacenamiento, teóricamente por tiempo indefinido, con las ventajas añadidas de la reducción de la erosión genética, mínimo espacio necesario, su aplicación con semillas ortodoxas y recalcitrantes, conservación de la variación inter e intrapoblacional, riesgo mínimo de enfermedades y corto tiempo necesario para la producción de un elevado número de propágulos (Graudal *et al.*, 1997).

Los embriones somáticos constituyen un material muy adecuado para ser crioconservados, con la consiguiente aplicación de esta tecnología a la mejora forestal. La estrategia que se sigue más habitualmente para solventar la incapacidad de clonar individuos de valor contrastado, consiste en generar líneas embriogénicas a partir de material juvenil, generalmente embriones cigóticos procedentes de parentales seleccionados o de

cruzamientos controlados. Una vez obtenidas se regeneran plantas que se implantan para su evaluación clonal, mientras que la línea embriogénica de la que proceden se introduce en crioconservación para mantener su potencial multiplicativo (Park *et al.* 1998). Evidentemente, si no se puede lograr la propagación a partir de árboles adultos, esta es una estrategia válida aunque costosa. La técnica, en todo caso, ya se está utilizando para mantener líneas embriogénicas de material con valor comercial (Engelmann *et al.*, 1997), pudiéndose aplicar tanto a gimnospermas (Klimaszewzka y Cyr, 2002) como a angiospermas (Valladares *et al.*, 2004).

### **Aplicación práctica de la embriogénesis somática: costes y estrategias de uso del material clonal**

Incluso en la palma de aceite, especie en la que la aplicación comercial de la embriogénesis somática está más extendida, con miles de hectáreas plantadas desde hace casi treinta años en Costa de Marfil, Malasia e Indonesia, los costes de producción (y en pequeña medida la variación somaclonal) son los principales cuellos de botella para su extensión. El precio de venta de las plantas somáticas no se ha podido disminuir de cinco veces el precio de las plantas procedentes de semillas selectas, fundamentalmente debido a que existe un lapso de 18 meses entre la introducción de los explantos iniciales en cultivo y la salida de las primeras plantas al campo, así como a la gran cantidad de mano de obra requerida (Rival, 2000). Sin embargo, a pesar de estos costes de producción, el cultivo con este material aún merece la pena: a una densidad de plantación de 145 árboles/ha y una edad promedio de planta de 25 años, los costes de producción usando embriogénesis somática se compensan por los rendimientos obtenidos (Brinks, 2000). En lo que respecta a coníferas, la mayor parte del trabajo realizado tiene lugar en el sector privado y por tanto la información disponible es muy genérica. En el caso de *Pinus radiata* en Nueva Zelanda, el coste de producción de plantas somáticas por embriogénesis (incluyendo la crioconservación durante cinco años mientras se llevan a cabo ensayos clonales) es casi cuatro veces el coste de producción de plantas por micropropagación (organogénesis), y a su vez estas superan en 5-7 veces a las obtenidas de semilla (Smith, 1999). Sin embargo, las empresas privadas mencionadas al principio están haciendo un esfuerzo inversor

para mejorar los procesos de regeneración, produciendo millones de plantas somáticas para establecer ensayos clonales en los futuros lugares de plantación. Así por ejemplo CellFor, en Canadá, ha producido en los últimos años plantas para establecer ensayos con más de 4.500 clones de *Picea glauca x engelmannii*, *P. glauca*, *P. sitchensis*, *Pinus radiata* y *P. taeda*, fundamentalmente, generando unos dos millones de plantas somáticas anualmente (Sutton, 2002). La compañía estadounidense Weyerhaeuser, centrada en *Pseudotsuga menziesii*, ha producido recientemente 100.000 plantas somáticas para establecer ensayos clonales (Gupta y Timmis, 2005). Adicionalmente esta empresa se encuentra a la cabeza de las patentes - la protección de la propiedad intelectual es muy activa en este campo — seguida de la también estadounidense Westvaco y de la canadiense CellFor, acumulando las tres los dos tercios del total (Cyr y Klimaszewska, 2002). Aunque la capacidad de multiplicación de los embriones somáticos mediante la embriogénesis recurrente puede ser muy alta y mantenida en el tiempo, y por tanto la capacidad de producción muy elevada, los costes de producción de planta son en la actualidad más caros que los del estaquillado, debido sobre todo al alto coste de la mano de obra requerida en las fases de maduración y germinación. En las técnicas de cultivo *in vitro* los costes de mano de obra suponen más de un 60% de los costes totales de producción, que podrían reducirse mediante la automatización de los procesos mediante los biorreactores que ya se están desarrollando (Gupta y Timmis, 2005).

Una de las grandes inquietudes que genera la utilización de material de origen somático es la disminución de la variabilidad que puede conllevar la silvicultura clonal, la cual podría suponer un gran riesgo ante las variaciones del medio biótico o abiótico. Al margen de la gran estabilidad que han demostrado muchos clones propagados vegetativamente durante cientos de años en diferentes ámbitos de actuación (viticultura, fruticultura, e incluso forestal), el problema ha preocupado durante años a la comunidad científica, que se ha centrado en la pregunta que formuló el genetista Libby: «¿cuál es un número seguro de clones por plantación?» (Libby, 1982). La silvicultura clonal puede y debe gestionar la variabilidad en las plantaciones para llegar al equilibrio entre ganancia genética y riesgo asumido. Muchas variables condicionan el posible riesgo derivado del uso de material clonal, entre otras, el turno de corta en el sitio a establecer, el grado de fiabilidad de los clones a plantar (por lo que es preceptivo realizar

los oportunos ensayos clonales), las prácticas silvícolas (incluyendo control de plagas) que se ejecutarán, etc. Existe un cierto acuerdo en que la cifra de clones a establecer en una plantación esté entre 15 y 30, que serían suficientes para conferir protección, al tiempo que no se perderían los beneficios de la silvicultura clonal (Libby y Ahuja, 1993). La forma en la que se dispondrían en la plantación, bien mezclados o en mosaico, también tendría incidencia sobre el riesgo. Alternativamente, se ha propuesto para reforestaciones en el este de Canadá acudir a una mezcla de clones y plantas procedentes de semilla. Por ejemplo, el 60% de las plantas lo constituiría una mezcla de los mejores clones identificados en ensayos genéticos, y el 40% restante proveniría de semillas de huertos semilleros. Además de reducir los costes de planta, este sistema incrementaría la diversidad inicial en la reforestación. Por otra parte, como en muchos casos hacia la mitad del turno de rotación se realiza un aclareo que puede llegar a ser del 40% del área plantada, quedarían para el final del turno los mejores árboles, tanto de los clones (presumiblemente la mayoría) como de algunas de las semillas, manteniendo con ello un mayor nivel de diversidad (Park, 2002).

El material clonal también se puede utilizar en la mejora de especies de crecimiento lento, como es el caso de las del género *Quercus*. En estas especies la instalación de huertos semilleros no ha dado los resultados esperados. Los primeros huertos semilleros clonales de robles en Europa se instalaron en Alemania a finales de los años 40, con el propósito principal de producción de semillas con fines operativos. Sin embargo los problemas derivados del rechazo a largo plazo de los injertos, así como la baja y variable tasa de producción de semillas que no podía satisfacer la demanda, han limitado su utilidad. A esto se unen los problemas típicos de que diferentes clones contribuyen de forma diferente a la cosecha de semillas, debido a sus diferentes patrones de floración, y al hecho de que el generalmente bajo número de clones utilizados en la mayoría de los huertos limitan selecciones futuras, con lo que su papel en los programas de mejora se ha reconsiderado, potenciando otras opciones de propagación (Kleinschmit, 1986). Para ello se ha propuesto que la aplicación práctica de su mejora genética descansa en dos pilares fundamentales (Savill y Kanowski, 1993):

1) La integración de todos los elementos clave del ciclo de mejora en una única población física [para

cada situación ambiental], que serviría como un ensayo genético, base para la selección, y fuente de semillas mejoradas y propágulos.

2) El desarrollo y utilización de metodologías de multiplicación eficientes.

La embriogénesis somática podría ser la metodología de multiplicación adecuada a este propósito. Las especies del género *Quercus* se han estudiado con relativa intensidad, existiendo resultados prometedores (Wilhelm, 2000). En particular, como se puede lograr la inducción de embriogénesis en árboles adultos de algunas de sus especies (Hernández *et al.*, 2003; Toribio *et al.*, 2004) se dispone de una herramienta muy poderosa para poder clonar árboles seleccionados e instalar los oportunos ensayos clonales. Dichos ensayos podrían ser la base de esas robustas poblaciones de mejora referidas por Savill y Kanowski (1993), que permitirían no sólo obtener información de parámetros genéticos y ser una fuente futura de semillas mejoradas, sino también conservar genotipos selectos.

## Conclusión

La embriogénesis somática se está abriendo paso como la vía de regeneración más adecuada para complementar las técnicas de mejora clásica en diversas especies forestales, aplicándose ya por empresas privadas y Organismos de diversos países con fines semi-operativos, empezando por la evaluación clonal y la crioconservación de líneas embriogénicas a utilizar en cada lugar y propósito adecuado («fitness for purpose»). La genómica está tratando de determinar los procesos básicos que subyacen a esta vía de regeneración (Bishop-Hurley *et al.*, 2003; Charbit *et al.*, 2004) para que su consecución deje de estar basada en el «arte» de las técnicas del cultivo *in vitro* de los tejidos vegetales. Por otra parte, la posibilidad emergente de clonar mediante embriogénesis somática árboles adultos seleccionados con fiabilidad, podrá resolver el serio problema de las pérdidas de volumen de tronco constatadas en «ramets» procedentes del estaquillado de «ortets» de edades crecientes, como efecto de su «envejecimiento fisiológico» (Smith, 1999). Sin embargo, «el coste de producir árboles clónicos es más elevado que el de árboles propagados por semillas. Por tanto la silvicultura clonal probablemente se practicará en los sitios comercialmente más productivos para aprovechar las característi-

cas específicas de los clones evaluados. Así, los bosques clonales representarán solamente una porción de las plantaciones forestales. En la mayoría de los lugares a reforestar, la regeneración natural y otros métodos de gestión forestal que fomenten la silvicultura sostenible, cabe pensar que seguirán siendo la base principal de la reforestación (Bonga y Park, 2003)».

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de diversos proyectos de carácter nacional que han permitido el desarrollo de sus conocimientos y experiencia en este campo. Asimismo, en particular, agradecen al Grupo Empresarial ENCE la financiación del proyecto de transferencia denominado «Embriogénesis somática en especies forestales», del que forma parte este trabajo de revisión.

## Bibliografía

- ARRILLAGA I., TOBOLSKI J.J., MERKLE S.A., 1994. Advances in somatic embryogenesis and plant production in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) Plant Cell Rep 13, 171-175.
- ATTREE S.M., BUDIMIR S., FOWKE L.C., 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce *Picea mariana* and *Picea glauca*. Can J Bot 68, 30-34.
- BENOWICZ A., GROSSNICKLE S.C., EL-KASSABY Y.A., 2002. Field assessment of Douglas-fir somatic and zygotic seedlings with respect to gas exchange, water relations, and frost hardiness. Can J For Res 32, 1822-1828.
- BISHOP-HURLEY S.L., GARDNER R.C., WALTER C., 2003. Isolation and molecular characterization of genes expressed during somatic embryo development in *Pinus radiata*. Plant Cell Tissue Org Cult 74, 267-281.
- BONGA J.M., PARK Y.S., 2003. Clonal Propagation, Forest Trees. En: Encyclopaedia of Applied Plant Sciences (Thomas B., Murphy D., Murray B., eds). Elsevier (Academic Press), Oxford, UK. pp.1395-1402.
- BRINKS T., 2000. Application of Biotechnology in Selected Crops. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Eschborn, Germany [en línea]. Disponible en <http://www2.gtz.de/biotech/dokumente/biotech4.pdf> [Consulta: 29 agosto 2005]
- CABASSON C., ALVARD D., DAMBIER D., OLLI-TRAUT P., TEISSON C., 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell Tissue Org Cult 50, 33-37.
- CAMPBELL M.M., BRUNNER A.M., JONES H.M., STRAUSS S.H., 2003. Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. Plant Biotech J 1, 141-154.
- CARMAN J.G., BISHOP D.L., HESS J.R., 1996. Carbohydrates, minerals and free amino acids in *Triticum aestivum* L. Kernels during early embryony. J Plant Physiol 149, 714-720.
- CARRAWAY D.T., MERKLE S.A., 1997. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. Can J For Res 27, 1805-1812.
- CARRIER D.J., BOCK C.A., CUNNINGHAM J.E., CYR D.R., DUNSTAN D.I. 1997. (+)-ABA content and lipid deposition in interior spruce somatic embryos. In Vitro Cell Dev Biol Plant 33, 236-239.
- CHALUPA V., 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. Comm Inst For 14, 57-63.
- CHARBIT E., LEGAVRE T., LARDET L., BOURGEOIS E., FERRIÈRE N., CARRON M.P., 2004. Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of *Hevea brasiliensis* calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities. Plant Cell Rep 22, 539-548.
- CHEN X.L., LIM S.H., WONG S.M., LEE Y.H., YAM Y.H., LIN J.J., 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of vandaceous orchids. Plant Sci (Limerick) 141, 183-189.
- CHOI Y-E., YANG D-C., CHOI K-T., 1998. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell Tissue Org Cult 52, 177-181.
- CONDE P., LOUREIRO J., SANTOS C., 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. Plant Cell Rep 22, 632-639.
- CUENCA B., SAN-JOSÉ M.C., MARTÍNEZ M.T., BALLESTER A., VIEITEZ A.M., 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Rep 18, 538-543.
- CYR D.R., KLIMASZEWSKA K., 2002. Conifer somatic embryogenesis: II Applications. Dendrobiology 48, 41-49.
- DHIR S.K., OGLESBY J., BHAGSARI A.S., 1998. Plant regeneration via somatic embryogenesis, and transient gene expression in sweet potato protoplasts. Plant Cell Rep 17, 665-669.
- ENGELBORGH S., SWENNEN R., VAN CAMPENHOUT S., 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp. Infomusa 7, 3-6.
- ENGELMANN F., TAKAGI Y.H., 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI, Rome 496 pp.
- ENGELMANN F., LARTAUD M., CHABRILLANGE N., CARRON M.P., ETIENNE H., 1997. Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. Cryo-letters 18, 107-116.

- ETIENNE H., BERTHOULY M., 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Org Cult* 69, 215-231.
- ETIENNE H., LARTRAUD M., MICHAUX-FERRIÈRE N., CARRON M.P., BERTHOULY M., TEISSON C., 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33, 81-87.
- FAO (2004) Report of the 13th Session of the FAO Panel of Experts on Forest Genetic Resources. Rome, Italy. 10-112 November 2003. FO: FGR/13/Rep.
- FÉRAUD-KELLER C., ESPAGNAC H., 1989. Conditions d'apparition d'une embryogénèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Can J Bot* 67, 1066-1070.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., 1997. Embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.). Tesis Doctoral. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., CELESTINO C., TORIBIO M., 1994. Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. En: *Biotechnology of Trees* (Pardos J.A., Ahuja M.R., Elena Rossello R., eds). Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie n.º 4. INIA. Madrid, España. pp. 105-110.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., CELESTINO C., TORIBIO M., 1995. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* L. *Plant Cell Tissue Org Cult* 41, 99-106.
- GALLEGO F.J., MARTÍNEZ I., CELESTINO C., TORIBIO M., 1997. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos. *Int J Plant Sci* 158, 563-567.
- GRAUDAL L., KJAER E., THOMDEN N., LARSEN A.B., 1997. Planning national programmes of forest genetic resources. Technical Note n.º 48. Danida Forest Seed Centre.
- GROSSNIKLE S.C., ROBERTS D.R., MAJOR J.E., FOLK R.S., WEBSTER F.B., SUTTON B.C.S., 1992. Integration of somatic embryogenesis into operational forestry: Comparison of interior spruce emblings and seedlings during production of + stock. En: *Proc. Intermountain Forest Nursery Association*, 1991, Fort Collins. U.S.D.A. Forest Service. pp. 106-113.
- GUPTA P.K., TIMMIS R., 2005. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures - progress towards commercialization. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81: 339-346.
- HACKMAN I., VON ARNOLD S., 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *J. Plant Physiol* 121, 149-158.
- HEINZE B., SCHMIDT J., 1995. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica* 85, 341-345.
- HERNÁNDEZ I., CELESTINO C., ALEGRE J., TORIBIO M., 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep* 21, 765-770.
- HORNERO J., MARTINEZ I., CELESTINO C., GALLEGO F.J., TORRES V., TORIBIO M., 2001. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. *Int J Plant Sci* 162, 827-833.
- JANEIRO L.V., VIEITEZ A.M., BALLESTER A., 1996. Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axes of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Rep* 15, 699-703.
- JOY R.W., MCINTYRE D.D., VOGEL H.J., THORPE T.A., 1996. Stage-specific nitrogen metabolism in developing carrot somatic embryos. *Physiol Plant* 97, 149-159.
- KAMADA H.K., KOBAYASHI T.K., HARADA H., 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 1163-1166.
- KHAW C.H., NG S.K., DREW R.A., 1998. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantings in Malaysia. *Acta Hort* 461, 251-258
- KLEINSCHMIT J., 1986. Oak breeding in Germany: experiences and problems. *Proc. IUFRO Joint meeting of Working Parties on Breeding Theory, Progeny Testing and Seed Orchards*, Williamsburg, VA, USA. 13-17 October. pp. 250-258.
- KLIMASZEWSKA K., CYR D.R., 2002. Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiology* 48, 31-39.
- LAARMAN J.G., SEDJO R.A., 1992. *Global forests: issues for six billion people*. McGraw Hill, Inc. New York, USA.
- LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R., 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Gen* 60, 197-214.
- LELU M.A., BASTIEN C., DRUGEAULT A., GOUEZ M.L., KLIMASZEWSKA K., 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with or without growth regulators. *Physiol Plant* 105, 719-728.
- LIAN C., OISHI R., MIYASHITA N., HOGETSU T., 2004. High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*. *Theor Appl Genet* 108, 836-841.
- LIBBY W.J., 1982. What is a safe number of clones per plantation? En: *Resistance to disease and pests in forest trees* (Heybrook H.M., Stephan B.R., von Weissenberg K., eds). Pudoc, Wageningen, The Netherlands. pp. 342-360.
- LIBBY W.J., AHUJA M.R., 1993. The genetics of clones. En: *Clonal Forestry. Vol 1 Genetics and Biotechnology* (Ahuja M.R., Libby W.J., eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 5-13.
- MAGNAVAL C., NOIROT M., VERDEIL J.L., BLATTES A., HUET C., GROSDÉMANGE F., BEULÉ T., BUFFARD-MOREL J., 1997. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. *J Plant Physiol* 150, 719-728.
- MALABADI R.B., VAN STADEN J., 2005. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiol* 25, 11-16.

- MERKLE S.A., 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Cult Biotech* 1, 112-121.
- MERKLE S.A., WIECKO A.T., SOTAK R.J., SOMMER H.E., 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 1086-1093.
- MERKLE S.A., WATSON-PAULEY B.A., 1994. *Ex vitro* conversion of pyramid magnolia somatic embryos. *Hort-Sci* 29, 1186-1188.
- MERKLE S.A., BATTLE P.J., 2000. Enhancement of embryogenic culture initiation from tissues of mature sweetgum trees. *Plant Cell Rep* 19, 268-273.
- MERKLE S.A., DEAN J.F.D., 2000. Forest tree biotechnology. *Current Opinion Biotech* 11, 298-302.
- MICHAUX-FERRIÈRE N., 1998. Zygotic embryogenesis as a model for somatic embryogenesis? Some examples from tropical trees. COST «EUROSILVA» Working group I: Growth and Development. Workshop: Advances on somatic embryogenesis in forest trees. Orleans. France.
- MICHAUX-FERRIÈRE N., GROUT H., CARRON M.P., 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am J Bot* 79, 174-180.
- MONTORO P., ETIENNE H., CARRON M.P., 1995. Relation between nitrogen uptake, aminoacid contents and embryogenic intensity of rubber tree calli. *J Plant Nutr* 18, 1693-1704.
- NAGMANI R., BONGA J.M., 1985. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can J For Res* 15, 1088-1091.
- PÂQUES M., 1999. Industrial applications of forest biotechnology. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics (Espinel S., Ritter E., eds) Biofor' 99. Vitoria-Gasteiz, España. pp. 525-526.
- PARK Y.S., 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann For Sci* 59, 651-656.
- PARK Y.S., POND S.E., BONGA J.M., 1993. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theor Appl Gen* 86, 427-436.
- PARK Y.S., POND S.E., BONGA J.M., 1994. Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination and cryopreservation. *Theor Appl Gen* 89, 742-750.
- PARK Y.S., BARRETT J.D., BONGA J.M., 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 34, 231-239.
- PEÑA L., SÉGUIN A., 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotech* 19, 500-506.
- PREECE J.E., 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? *Plant Tissue Cult Biotech* 1, 26-37.
- PUIGDERRAJOLS P., FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., TORIBIO M., MOLINAS M., 1996. Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int J Plant Sci* 157, 674-684.
- RAMAGE C.M., WILLIAMS R.R., 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 38, 116-124.
- RAMAROSANDRATANA A., HARVENGT L., GARIN E., PÂQUES M., CALVAYRAC R., 1999. Factors influencing the development of mature somatic embryos of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics (Espinel S., Ritter E., eds) Biofor' 99. Vitoria-Gasteiz, España. pp. 271-274.
- RANCILLAC M., KLINGUER A., KLINGUER S., MILLET B., 1996. Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L.) *Plant Growth Regul* 20, 67-73.
- RAO P.S., 1965. *In vitro* induction of embryonal proliferation in *Santalum album* (L.) *Phytomorphology* 15, 175-179.
- REIDIBOYM-TALLEUX L., DIEMER F., SOURDIOUX M., CHAPELAIN K., DE MARCH G.G., 1998. Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. *Plant Cell Tissue Org Cult* 55, 199-209.
- RIVAL A., 2000. Somatic embryogenesis in oil palm. En: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 6 (Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J., eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 249-290.
- RUAUD J.N., BERCETCHE J., PÂQUES M., 1992. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies*. *Plant Cell Rep* 11, 563-566.
- RUAUD J.N., PÂQUES M., 1995. Somatic embryogenesis and rejuvenation of trees. En: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 1, History, Molecular and Biochemical Aspects, and Applications (Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J., eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 99-118.
- RUGKHLA A., JONES M.G.K., 1998. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum*. *J Exp Bot* 49, 563-571.
- SAVILL P.S., KANOWSKI P.J., 1993. Tree improvement programs for European oaks: goals and strategies. *Ann Sci For* 50, 368s-383s.
- SMITH D.R., 1999. Successful Rejuvenation of Radiata Pine. Proceedings 25<sup>th</sup> Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. New Orleans, Louisiana, USA. July 11-14, pp. 158-167.
- SMITH D.L., KRIKORIAN A.D., 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Amer J Bot* 76, 1832-1843.
- SUTTON B., 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann For Sci* 59, 657-661.
- SUTTON W.R.J., 1999. Does the world need planted forests? *New Zealand J For* 44, 24-29.
- SUTTON W.R.J., 2000. Wood in the third millennium. *Forestry Prod J* 50, 12-21.

- TIBOK A., POWER J.B., DAVEY M.R., 1995. Progress in protoplast technology for woody angiosperms. En: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol 1, History, Molecular and Biochemical Aspects, and Applications (Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J., eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 143-166.
- TORIBIO M., CELESTINO C., GALLEGO J., MARTÍNEZ I (2000) Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. En: Development of Integrated Systems for large-scale Propagation of elite Plants using In Vitro Techniques (Ó Ríordáin F., ed). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. EUR 19237. pp 236-237.
- TORIBIO M., FERNÁNDEZ C., CELESTINO C., MARTÍNEZ M.T., SAN-JOSÉ M.C., VIEITEZ A.M., 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. Plant Cell Tissue Org Cult 76, 283-287.
- VÁGNER M., VONDRÁKOVÁ Z., FISCHEROVÁ L., OPATRŇÁ J., 2005. Norway spruce somatic embryogenesis: membrane rafts as compromise between liquid and solidified media. En: Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation (Hvoslef-Eide A.K., Preil W., eds). Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp 295-302.
- VALLADARES S., TORIBIO M., CELESTINO C., VIEITEZ A.M., 2004. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. CryoLetters 25, 177-186
- VASIL I.K., 1995. Cellular and molecular genetic improvement of cereals. En: Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology (Terzi M., Cella R., Falavigna A., eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 5-18.
- VENDRAME W.A., COCHERT G., WETZSTEIN H.Y., 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. Plant Cell Rep 18, 853-857.
- WEBSTER F.B., ROBERTS D.R., MCINNIS S.M., SUTTON B.C.S., 1990. Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. Can J For Res 20, 1759-1765.
- WILHELM E., 2000. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) In Vitro Cell Dev Biol - Plant 36, 349-357.
- WILHELM E., HRISTOFOROGLU K., FLUCH S., BURG K., 2005. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.) Plant Cell Rep 23, 790-795.
- YANTCHEVA A., VLAHOVA M., ANTANASSOV A., 1998. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Rep 18, 148-153.
- ZOBEL B., TALBERT J., 1984. Applied forestry improvement. John Willey & Sons, New York, USA.