


 Universidad Politécnica de Cartagena

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA



Anna Whipkey. New Crop Center

Biotecnología Vegetal. Curso 2013-2014

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ADVENTICIA O ASEJUAL)

Adventicios: desarrollo de embriones desde puntos de origen no usuales, incluyendo callos.

Células o tejidos somáticos → Embriones somáticos
 Embriones adventicios
 Embrioides

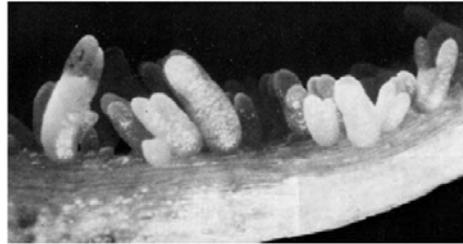
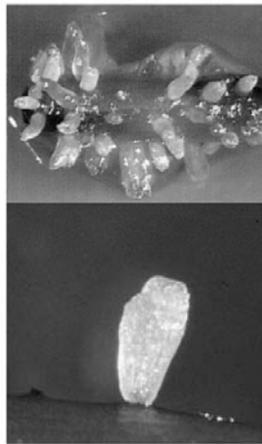
Estructura bipolar (eje caulinar y eje radicular) que no posee conexión vascular con el tejido materno



Fusión de dos gametos → Embrión cigótico

La embriogénesis somática *in vitro* fue descrita por primera vez en 1958 en cultivos de tejidos de *Daucus carota* (zanahoria) por Steward et al y por Reinert.

¿Caulogénesis o embriogénesis somática?



¿Caulogénesis o embriogénesis somática?

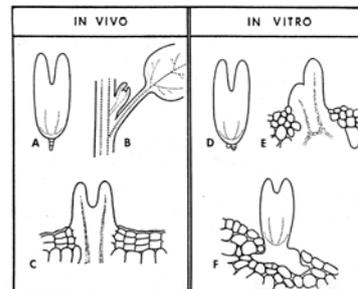
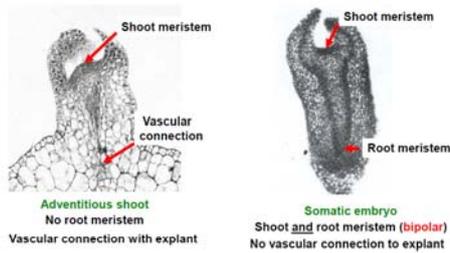
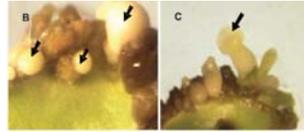


Fig. 1A-F — Difference of anatomy in the basal ends of embryos (A, D, F) and buds (B, C, E) under normal and in vitro conditions.

(Haccius, 1978. Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus culture)

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *in vitro*

- ✓ **DIRECTA:** El material inicial está ya completamente rejuvenecido.

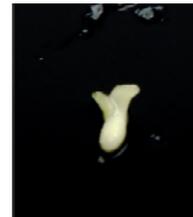


Coffea arabica. Gatica et al 2009

- ✓ **INDIRECTA:** Se debe producir un rejuvenecimiento completo en el que las células diferenciadas deben desdiferenciarse (formación del callo) para ser redeterminadas como células embriogénicas.



Embriones somáticos = Estructuras bipolares que desarrollan precoz y simultáneamente un eje radicular y apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas completas y normales.



- **Estadios de desarrollo en dicotiledóneas:**

- Globular
- Corazón
- Torpedo
- Cotiledonario



Fases de la embriogénesis somática indirecta

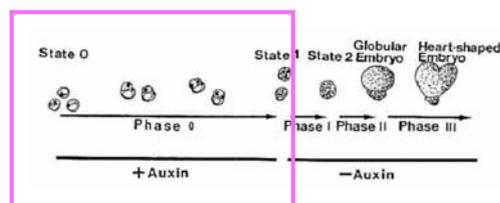
(diferentes según autores)

1. Inducción de callos proembriogénicos
2. Proliferación de callos o de masas proembriogénicas (PEM)
3. Desarrollo y maduración de los embriones
4. Germinación de los embriones y regeneración de plantas
5. Aclimatación *ex vitro* de las plantas

Generalmente, cada fase (1-4) requiere un medio y condiciones de cultivo específicos

Fase 1. INDUCCIÓN DE CALLOS PROEMBRIOGÉNICOS

A partir del explanto (células diferenciadas) se produce un crecimiento celular dando lugar a un callo desorganizado (células vacuolizadas) en el que algunas células cambian el patrón de expresión génica por otro patrón de expresión del gen o genes implicados en la embriogénesis (células determinadas), a partir de las cuales se forman agregados celulares embriogénicos. Este proceso se realiza en presencia de auxina en el medio de cultivo.



Fase 1. INDUCCIÓN DE CALLOS PROEMBRIOGÉNICOS

En algunos casos, se puede producir la diferenciación de embriones ya en esta fase. Ejemplo: patrón de vid "1103 de Paulsen".



Fase 2. PROLIFERACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS

Multiplicación indefinida de los cultivos embriogénicos mediante subcultivos sucesivos en medio fresco, sin que pierdan su capacidad embriogénica ni su viabilidad.

El factor más fuerte asociado con la proliferación continua de las células embriogénicas es la auxina, aunque el tipo y la concentración necesaria varía de acuerdo a la especie o incluso la variedad.



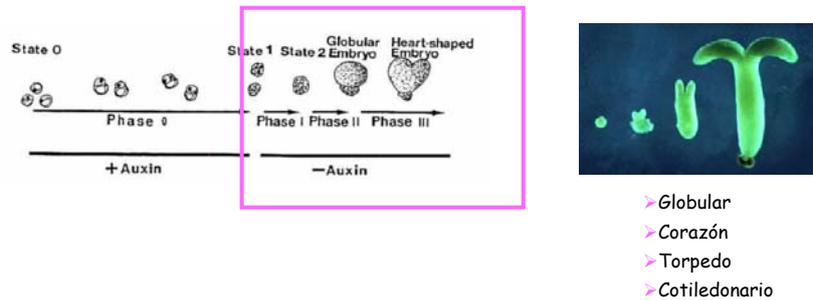
Sólido



Líquido

Fase 3. DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES

Los agregados celulares formados a partir de una sola célula, adquieren la capacidad de desarrollar embriones, generalmente, cuando la auxina se elimina del medio de cultivo. Al principio estos agregados se desarrollan relativamente lentos y aparentemente sin diferenciación pero después se produce una rápida división celular en ciertas partes de los agregados, dando lugar a la formación del embrión globular, que sigue desarrollándose pasando por corazón, torpedo y finalmente cotiledonario.





Fase 3. DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES

Embriogénesis somática secundaria: formación de nuevos embriones sobre los embriones somáticos ya formados. En muchas especies, generalmente se observa en la zona de transición raíz/tallo y en la zona de la raíz, confirmando un gradiente de competencia embriogénica a lo largo del tejido del embrión, además parece que el genotipo también influye en la capacidad de formación de embriones secundarios.



Dependiendo de la finalidad de nuestro trabajo, en algunos casos puede ser favorable (transformación genética a partir de embriones somáticos) y en otros casos es un problema (semillas artificiales).

Fase 4. Germinación de los embriones y regeneración de plantas

Los embriones somáticos se aíslan del callo y se siembran en un medio de cultivo adecuado para su correcta germinación. Esta fase se realiza bajo fotoperíodo.



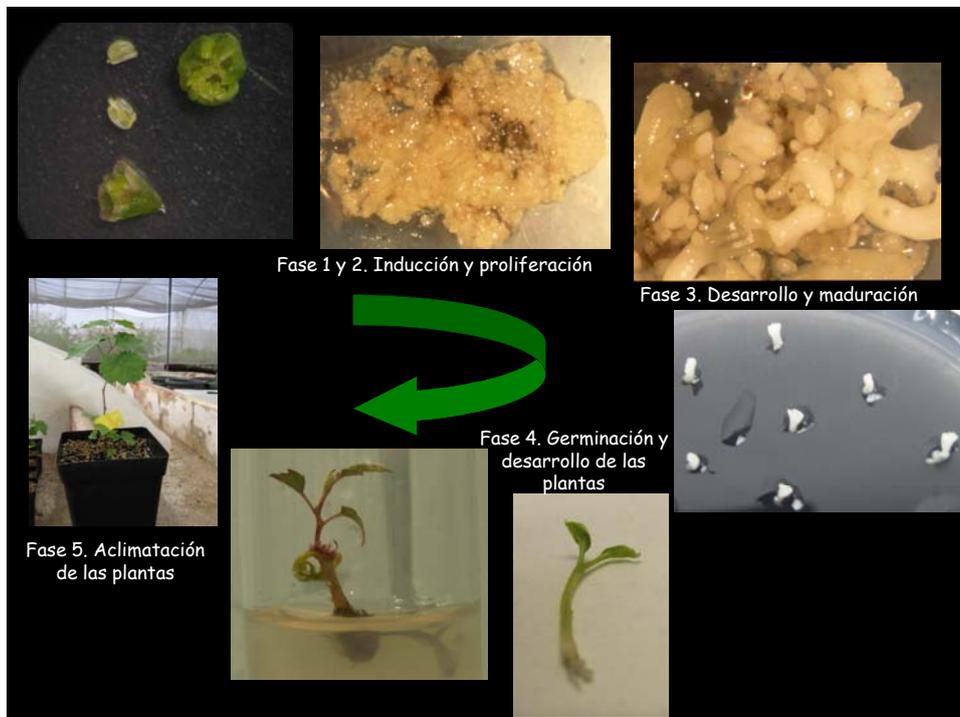
Fase 4. Germinación de los embriones y regeneración de plantas

Los embriones somáticos germinados se transfieren generalmente a otro medio de cultivo para el desarrollo completo de las plantas.



Fase 5. Aclimatación de las plantas

Las plántulas se trasplantan a maceta, se mantienen en una cámara de aclimatación en condiciones controladas y posteriormente se pasan a invernadero.



▪Factores que influyen en la embriogénesis somática

- Condiciones fisiológicas de la planta
- Genotipo
- Tipo de explanto
- Medio de cultivo
- Otras condiciones seleccionadas para realizar el cultivo



- Desarrollar protocolos específicos de regeneración mediante embriogénesis somática, para cada especie o incluso para cada variedad

▪Factores que influyen en la embriogénesis somática

- Condiciones fisiológicas de la planta
 - Buen estado nutricional y sanitario.



Factores que influyen en la embriogénesis somática

2. Genotipo

- Familia / Especie / Variedad / Clon

En cereales y otras gramíneas, la embriogénesis somática tiene gran importancia, debido a que la regeneración vía organogénesis por manipulación de la relación auxina/citoquinina ha sido infructuosa.
- Crucíferas: *Brasica napus*, *Cheiranthus cheiri*
- Gramíneas: *Bromus inermis*, *Sorghum bicolor*
- Umbelíferas: *Daucus carota*, *Apium graveolens*
- Rutaceas: *Citrus microcarpa*, *Citrus sinensis*
- Solanaceas: *Atropa belladonna*, *Solanum melongena*
- Vitáceas: *Vitis vinifera*, *V. rupestris*
- etc

Factores que influyen en la embriogénesis somática

3. Explanto

- Hojas, pecíolos, tallo, raíces, Anteras, Ovarios, Embriones cigóticos, zarcillos de vid, filamentos de anteras de vid, etc.
- Un mismo tipo de explante no actúa igual en distintas especies y variedades.
- Dentro de una planta no todos los tejidos tienen la misma aptitud embriogénica.
- Estado de desarrollo del explante: generalmente se emplean tejidos jóvenes. Ej: anteras inmaduras de vid, en estado de microsporas uninucleadas.
- Preacondicionamiento del explante. Ejemplo: mantenimiento en frío (4°C) durante un tiempo, de las inflorescencias de vid antes del cultivo *in vitro* de anteras y ovarios, puede aumentar el porcentaje de callos embriogénicos obtenidos.

Factores que influyen en la embriogénesis somática

4. Medio de cultivo

Fases 1 y 2. Inducción y proliferación

- Medio salino: MS, NN, etc.
- Reguladores del crecimiento:
 - Auxinas: 2,4-D, NOA.
 - Citoquininas: BA u otras (en algunos casos no son esenciales pero pueden favorecer).
- Nitrógeno reducido: sales de amonio, leche de coco, hidrolizado de caseína o aminoácidos (L-glutamina o L-alanina).
- Tipo y concentración de agente solidificante: agar u otros polímeros.

Factores que influyen en la embriogénesis somática

4. Medio de cultivo

Fase 3. Desarrollo y maduración.

- Medio salino: MS, NN, etc
- Medio sin reguladores del crecimiento, reducción de la concentración o combinaciones distintas a las empleadas en el medio de inducción, en este caso se suele sustituir el 2,4-D por IAA (menos potente).
- Carbohidratos, entre ellos la sacarosa, en concentraciones de 3-6% son esenciales.
- El ABA promueve el desarrollo y maduración de los embriones somáticos, impidiendo su germinación precoz y permitiendo la sincronización de la maduración y germinación de los embriones.

▪Factores que influyen en la embriogénesis somática

▪ 4. Medio de cultivo

▪ Fase 3. Desarrollo y maduración.

▪ Otros componentes: Carbón activo.



▪Sin carbón activo



▪Con carbón activo

▪ Fase 4. Germinación y regeneración de plantas.

▪ Medio salino: MS, NN, etc.

▪ Medio sin reguladores del crecimiento o combinaciones distintas a las empleadas en los medios anteriores: IAA y/o IBA, ABA, GA3, BA.

▪Factores que influyen en la embriogénesis somática

▪ 5. Otras condiciones

▪ Iluminación: las primeras etapas de inducción y desarrollo suelen realizarse en oscuridad aunque algunas especies requieren iluminación. Posteriormente, el embrión somático se suele transferir a fotoperíodo para su germinación.

▪ Temperatura: varía en función de la especie pero suele estar comprendida entre los 22° y 28°C. Algunas plantas necesitan un choque frío para iniciar la formación y el posterior desarrollo de los embriones.

▪Problemas durante el proceso de embriogénesis somática y regeneración de plantas

- 1. Obtención de cultivos no sincrónicos en el proceso de desarrollo de los embriones.
- En muchas especies, los callos embriogénicos son una mezcla de embriones en los distintos estados de desarrollo: globular, corazón, torpedo, cotiledonario. Esto puede ocasionar una disminución en la eficiencia de regeneración de plantas y un elevado coste si se quiere emplear la E.S. para la producción de plantas a gran escala.
- Soluciones propuestas:
 - Cultivos líquidos y empleo de filtros de distintos tamaños para separar los embriones.
 - Fraccionamiento por centrifugación en gradiente de densidad en una solución de Ficoll y selección de las poblaciones embriogénicas (más densas en *Fraxinus angustifolia*).

▪Problemas durante el proceso de embriogénesis somática y regeneración de plantas

- 2. Problemas en la germinación de los embriones somáticos y en su conversión en plantas.
- Anomalías morfológicas y fisiológicas de los embriones somáticos →
 - "Germinación precoz" debido probablemente a una insuficiente acumulación de los reguladores del crecimiento.
 - Una actividad metabólica anormal y una inusual acumulación de productos de reserva, sin su posterior hidrólisis y utilización.
 - Elevado contenido en poliaminas libres y/o una inadecuada relación putrescina/espermidina.



•Problemas durante el proceso de embriogénesis somática y regeneración de plantas

- 2. Problemas en la germinación de los embriones somáticos y en su conversión en plantas.
- Dormición. Estrategias para romper la dormición en E.S. de vid:
 - el tratamiento en frío a 2-4°C de los cultivos embriogénicos de vid induce una rápida reducción del contenido endógeno de ABA en los embriones somáticos y mejora la germinación, mientras que la adición exógena de ABA al medio de cultivo inhibe la germinación. Este tratamiento parece que también puede actuar sobre el metabolismo de sustancias endógenas similares a las giberelinas.
 - Adición de ácido giberélico y/o IAA en el medio de germinación de los embriones.
 - Deshidratación de los E.S y posterior rehidratación.

•Problemas durante el proceso de embriogénesis somática y regeneración de plantas

- 2. Problemas en la germinación de los embriones somáticos y en su conversión en plantas.
- Condiciones de cultivo.
 - Elevada humedad durante el cultivo *in vitro* reduce el % de conversión de los embriones en plantas.
 - Presencia de productos de actividad metabólica de los cultivos excretados al medio → subcultivos diarios.
 - Acumulación de proteínas extracelulares → Disminuir la concentración celular y la densidad de población inicial.
 - En vid se han correlacionado diferentes anomalías con los reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo durante la maduración de los embriones → ajustar los reguladores del crecimiento adecuados para conseguir un correcto desarrollo morfológico y fisiológico del embrión.

•Problemas durante el proceso de embriogénesis somática y regeneración de plantas

- 2. Problemas en la germinación de los embriones somáticos y en su conversión en plantas.
 - Otros tratamientos propuestos para conseguir la germinación de los E.S. de vid.
 - Tratamientos con BA sola o combinada con IBA.
 - Eliminación de los cotiledones.
 - Tener en cuenta que el genotipo y el estado de desarrollo del embrión somático influyen fuertemente la efectividad del tratamiento.

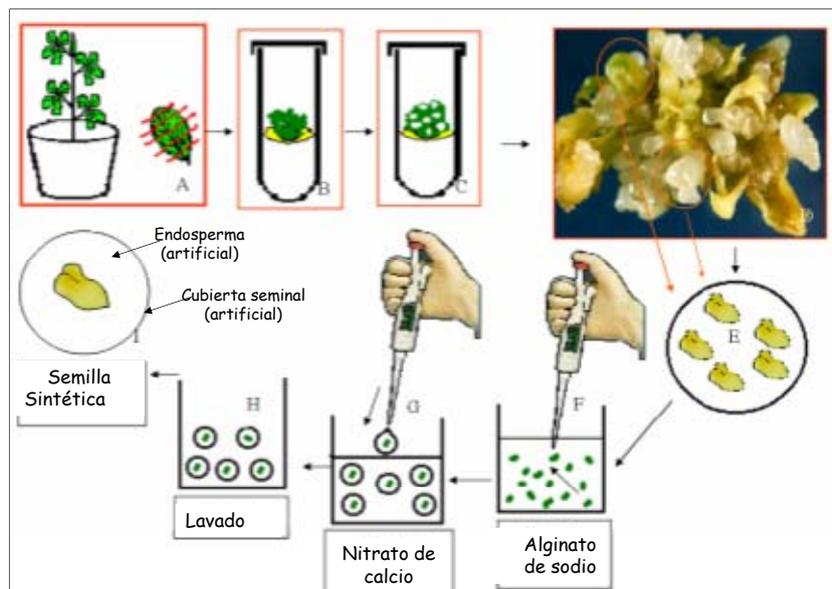
APLICACIONES

**Semillas sintéticas o artificiales
Transformación genética
Variación somaclonal
Eliminación de virus
Producción de metabolitos secundarios**

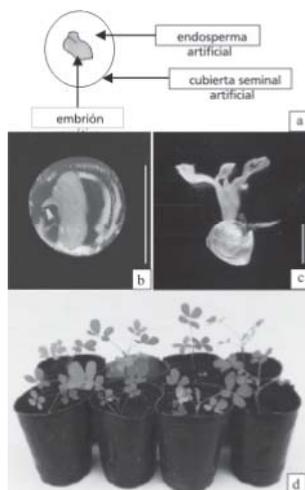
1. Semillas artificiales

- Un simple embrión somático provisto de una cubierta protectora. Esta "semilla artificial", puesta en condiciones adecuadas, germina y se convierte en una planta. Estos embriones deben ser estructuras bipolares perfectas (con un polo que genere el vástago y el otro la raíz) capaces de convertirse (germinar) en plantas enteras.
- Cubierta protectora:
 - Polímeros: gel de alginato, gelatina, agar, goma, etc.
 - Protección, nutrición, permeable al agua, biodegradable.
- Usos: Producción en masa de plantas genéticamente iguales.
- Especies: Alfalfa, lechuga, apio, zanahoria, orquídeas, algodón, Azadirachta y especies forestales *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Santalum album* y *Pseudotsuga*
- Procedimiento (ejemplo):
Los embriones somáticos se colocan en una solución de alginato de sodio al 2% y posteriormente se pasan a una solución complejante de de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 100 mM .

1. Semillas artificiales



1. Semillas artificiales



Requisitos para que esta tecnología sea comercialmente competitiva:

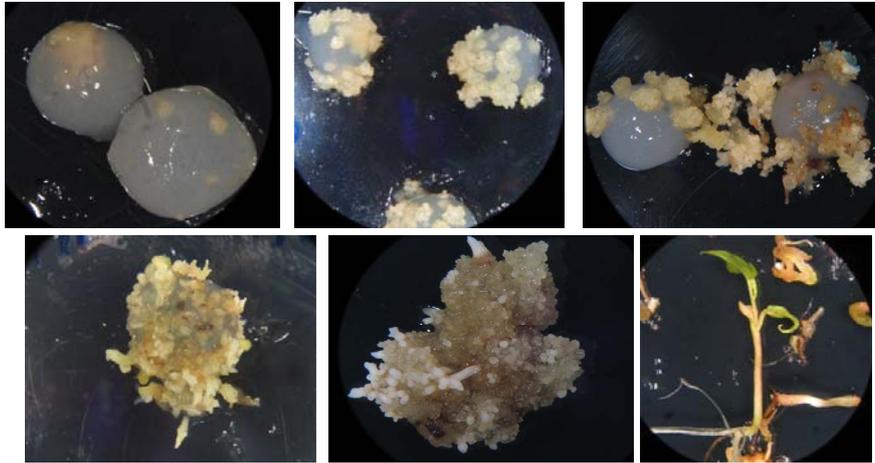
- sistema de embriogénesis somática reproducible, con altos niveles de producción de embriones vigorosos y de alta calidad fisiológica.
- producción sincronizada y a gran escala: biorreactores y sistemas mecanizados de encapsulamiento.
- embriones simples en estado cotiledonario, que no se fusionen entre sí y que no generen embriones secundarios.
- adecuada maduración de los embriones: Tratamientos con ácido abscísico, maltosa y pretratamientos con temperaturas bajas (4°C) (alfalfa).
- Germinación rápida y desarrollo de plántulas en frecuencias similares a la semilla natural.

1. Semillas artificiales

Las **ventajas** inherentes a la semilla artificial

- Producción de gran cantidad de embriones somáticos y por tanto, de semillas.
- Empleo de técnicas de manejo iguales a las convencionales de las semillas naturales.
- Propagación de cultivos de alto valor comercial (genotipos élite) idénticos a la planta madre.
- Reproducción de especies de coníferas con ciclos reproductivos muy largos para producir semillas.
- Mantenimiento de genotipos híbridos obtenidos a partir semillas híbridas producidas de forma manual en ciertas especies importantes (híbridos de cultivos autógamos como soja y algodón o híbridos triploides de sandía para producir sandías sin semilla) Estos híbridos son muy caros y su mantenimiento permitiría el acceso de un gran número de agricultores a dicha semilla.
- Almacenamiento de germoplasma.

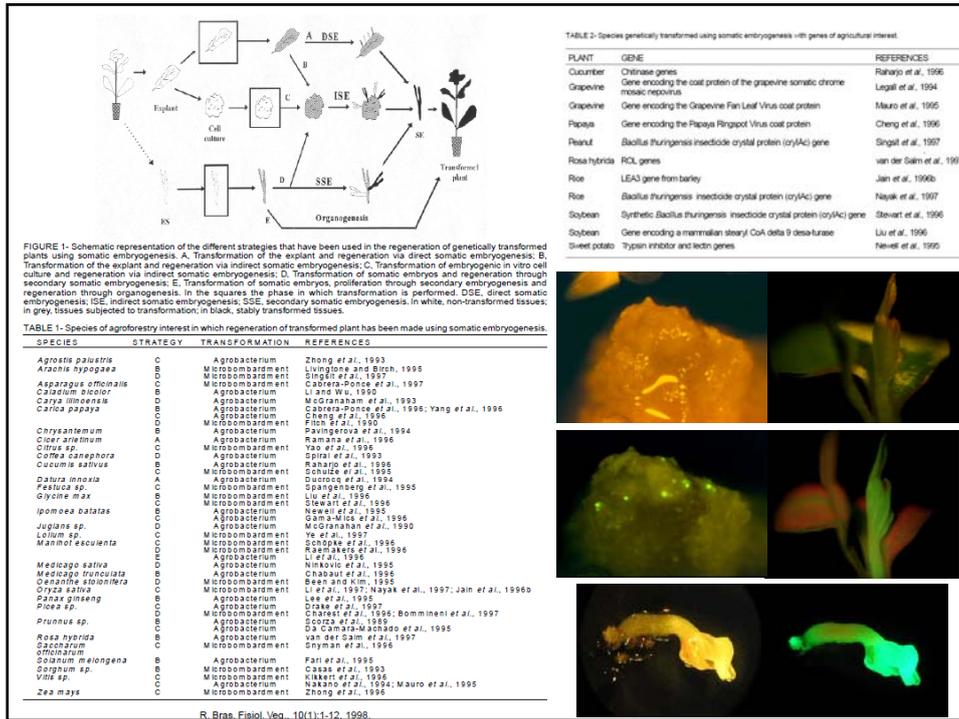
2. Conservación de germoplasma



2. Transformación genética

Mejora molecular, genómica funcional, silenciamiento génico, sobreexpresión de genes.





3. Variación somaclonal



Variantes somaclonales de vid, variedad Monastrell.

4. Eliminación de virus



Nº callo embriogénico	Plantas analizadas	Plantas positivas para GLRaV (serotipo)	Plantas libres de virus
1	1	1 (3)	0
2	3	1 (3)	2
3	6	1 (1,3) 4 (3)	1
4	7	3 (3)	4
5	3	1 (3)	2
7	27	1 (1) 16 (3)	10
Total	47	28	19

Resultados del test ELISA para detectar la presencia de los serotipos 1, 2 y 3 del virus del enrollado (GLRaV) en plantas de vid de la variedad Don Mariano, regeneradas *in vitro* mediante embriogénesis somática.

En 19 plantas no se detectó ninguno de los tres serotipos y en ninguna de las 47 regeneradas se detectó el serotipo 2

5. Producción de metabolitos secundarios



Fig. 5. Production of somatic embryos in bioreactor. (A) Embryogenic callus used to initiate cell suspension culture. (B) Somatic embryo production in an air-lift balloon type bubble bioreactor. (C-E) Embryo fractions obtained after 4 weeks of culture, after filtration through different sieves to enrich in specific developmental stages (C, globular; D, heart; E, cotyledonary). (F) Germinated somatic embryos in a bioreactor after 6 weeks of culture. (G) Germinated somatic embryo production in a continuous immersion BTBS.

Table 2
Content of secondary metabolites in selected plant materials of *E. sessiliflorus*

Plant materials	Eleutherosides (mg/g DW)				Chlorogenic acid (mg/g DW)	Total phenolics (mg/g DW)	Total Flavonoid (mg/g DW)
	B	E	E ₁	Total			
Globular	0.0114d ^a	0.0209d	0.0124f	0.0447f	0.2406bc	4.52g	3.91d
Heart	0.0157b	0.0113f	0.0270d	0.054d	0.1434c	12.89e	9.54cd
Torpedo	0.0146c	0.0110f	0.0245e	0.0501e	0.0836c	13.86d	9.69cd
Cotyledonary	0.0144c	0.0171e	0.0066g	0.0380g	0.0973c	13.99de	10.01 cd
Germinated embryo	0.0163a	0.0626b	0.0696c	0.1484c	0.0345bc	18.43c	16.66 bc
Field grown leaf	0.0153b	0.1021a	1.3890a	1.5064a	1.8830a	23.27a	25.00a
Field grown root	0.0029e	0.0558c	0.1199b	0.1786b	0.4966b	11.74f	9.00 cd

^a Means with different letters within column are significantly different according to Duncan's multiple range test at 5% level.

A.M. Shohael et al. / Journal of Biotechnology 120 (2005) 228–236

