

**ENCAPSULADO DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y EMBRIONES CIGÓTICOS PARA  
OBTENCIÓN DE SEMILLAS ARTIFICIALES DE RAULÍ (*Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.)  
Oerst.)**

**Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech  
(*Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst.)**

**Priscila Cartes R.<sup>1\*</sup>, Hermes Castellanos B.<sup>3</sup>, Darcy Ríos L.<sup>1</sup>, Katia Sáez C.<sup>2</sup>, Scarlett Spierccolli  
H.<sup>1</sup>, y Manuel Sánchez O.<sup>1</sup>**

**ABSTRACT**

Somatic and zygotic embryos from mature seeds of rauli-beech, *Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst., were encapsulated in different artificial endosperms, in order to generate a cover that fulfills the function of nourishment and protection of the embryo, to facilitate its later germination. The content of sodium alginate varied in 4%, 3%, and 2% and the time of immersion in calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) that acts as complexing agent. Furthermore to the artificial endosperm components of the medium Murashige and Skoog (MS) were added, supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> indolacetic acid (IAA), 0.5 mg L<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA), 2 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP) and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose. Germinative behavior of encapsulated somatic and zygotic embryos was evaluated after 4 wk. Having compared the percentage of germination reached by the encapsulated somatic and zygotic embryos it was possible to observe that they had similar germinative behavior according to type of encapsulation applied. However, zygotic embryos surpassed widely the levels of germination reached by the somatic embryos, 100% vs. 45% respectively.

**Key words:** rauli-beech, somatic embryogenesis, synthetic seed, sodium alginate.

---

<sup>1</sup>Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Casilla 160-C, Concepción, Chile. E-mail: priscicartes@udec.cl \*Autor para correspondencia.

<sup>2</sup>Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Avda. Esteban Iturra s/n - Barrio Universitario, Concepción, Chile.

<sup>3</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera, Durango, México. Falta dirección postal

## RESUMEN

Embriones somáticos y cigóticos provenientes de semillas maduras de raulí, *Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst., se encapsularon en diferentes endospermas sintéticos con el fin de generar una cubierta que cumpla la función de nutrir y proteger al embrión para facilitar su posterior germinación. Se varió el contenido de alginato de sodio al 4%, 3% y 2% y el tiempo de inmersión en cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), el que actúa como agente acomplejante. Además, a la matriz artificial se adicionaron componentes del medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con:  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido indolacético (IAA),  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftalenacético (NAA),  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de 6-bencilaminopurina (BAP) y  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa. Al cabo de 4 semanas el porcentaje de germinación de los embriones somáticos y cigóticos encapsulados tuvieron similar comportamiento germinativo según el tipo de encapsulado aplicado. Sin embargo, los embriones cigóticos superaron ampliamente los niveles de germinación alcanzados por los embriones somáticos, 100% vs. 45%, respectivamente.

**Palabras clave:** raulí, embriogénesis somática, semilla sintética, alginato de sodio.

## INTRODUCCIÓN

Desde la década de los setenta el sector forestal ha sido uno de los más dinámicos de la economía de Chile, basado principalmente en plantaciones de *Pinus radita* D. Don y *Eucalyptus globulus* Labill. Esto ha provocado una participación minoritaria del bosque nativo en el sector productivo nacional (INFORCORFO, 1997). Sin embargo, mediante la Ley de Recuperación del Bosque Nativo y Fomento Forestal se busca incentivar la investigación, el mejoramiento de las especies y la mantención de sus ecosistemas, como una forma de fortalecer dicho recurso (CONAF, 2008).

El raulí es una especie nativa chilena que ha ido recuperando su importancia ecológica y económica a través de los años, después de haber sufrido un alto deterioro debido a la extracción indiscriminada de los mejores individuos del bosque provocando una disminución en la calidad de los ejemplares hoy existentes (Lara *et al.*, 1996; Sánchez-Olate *et al.*, 2000). La propagación de *N. alpina* mediante siembra directa presenta dificultades que radican en características intolerantes de la especie, siendo sólo exitosa en lugares donde el suelo mineral se encuentra expuesto a la luz (Loewe *et al.*, 1997; Donoso y Lara, 1999). Además, la baja viabilidad de las semillas, periodicidad en la producción de semillas (alta producción en ciclos cortos de 2 a 3 años) y ataque de insectos, influyen en el desarrollo de esta especie (Burschel *et al.*, 1976).

Las técnicas de micropropagación o cultivo *in vitro* surgen como alternativas para especies que no tienen la propiedad de producir semillas viables, es decir, que no pueden germinar y desarrollarse adecuadamente en su ambiente natural (González *et al.*, 2004). Entre las técnicas de micropropagación se señala a la embriogénesis somática o regeneración de embriones a partir de tejido vegetativo de *N. alpina* como una técnica eficiente que permite la propagación masiva de genotipos seleccionados, con fines productivos y/o de conservación (Castellanos *et al.*, 2004). El éxito de esta técnica depende del desarrollo de una serie de procesos en los que influye el genotipo de la planta madre o donadora de explantos y la concentración de reguladores del crecimiento exógeno, los que en combinaciones adecuadas permiten obtener una respuesta embriogénica determinante para la producción de embriones somáticos (SE) (Guerra *et al.*, 2001).

Los SE pueden ser inmersos en una matriz protectora constituyendo una semilla artificial o sintética generando un método conveniente para la propagación clonal de variedades de planta elite o de especies de difícil propagación en su ambiente natural (Fuji *et al.*, 1987). Los primeros indicios de propagación mediante semilla artificial se reportan en cultivos anuales como alfalfa (*Medicago sativa* L.) y caña de azúcar (*Saccharum* spp.) actualmente los sistemas de producción de semillas artificiales han progresado

sustancialmente en esta área, siendo los más avanzados en dirigir la siembra en condiciones *ex vitro* o de campo, obteniendo altos porcentajes de conversión a planta (Fuji *et al.*, 1987; Nieves *et al.*, 2003). Sin embargo, las tasas de germinación y posterior conversión a planta de los SE en diferentes especies leñosas, aún son bajas, debido principalmente a una maduración deficiente y asincrónica de los polos embrionarios, lo cual dificulta las etapas terminales del proceso (Tapia *et al.*, 1999; Castellanos *et al.*, 2004).

Diversos investigadores plantean que para controlar el crecimiento y facilitar la germinación del SE el endosperma sintético puede simular a un endosperma de origen sexual, conteniendo uno o varios compuestos como: nutrientes, reguladores del crecimiento, agentes protectores contra patógenos, herbicidas, biocontroladores, biofertilizantes, entre otros con el fin de asegurar la conversión a planta y el desarrollo en campo (Castillo *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2004; Malabadi y Van Staden, 2005). Por otro lado, la composición de la matriz protectora debe permitir el crecimiento de los embriones encapsulados otorgando una resistencia mecánica acorde a la energía disponible del embrión, ya que un endospermo excesivamente duro ocasiona una pérdida de energía y un crecimiento débil o nulo de los ES encapsulados (Jiménez y Quiala, 1998; González *et al.*, 2004). Se señala en la literatura la utilización de diversas sustancias (agar, gelrite, gomas) para encapsular ES, siendo la manipulación de la concentración de alginato de sodio y los tiempos de exposición al agente acomplejante cloruro de calcio, los que reportan mejores resultados de germinación y conversión a planta en especies leñosas (Patel *et al.*, 2000; Maruyama *et al.*, 2003; Utomo *et al.*, 2008).

Este estudio busca definir la composición del endosperma sintético, variando el contenido de alginato de sodio y tiempo de exposición al agente acomplejante, con el fin de generar un endosperma sintético que permita la normal germinación de los embriones encapsulados. Además se compara el comportamiento germinativo entre embriones somáticos y cigóticos encapsulados de *N. alpina*, para determinar la influencia del tipo de embrión en la respuesta germinativa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de estudio**

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales ubicado en el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, durante el año 2006 y parte del primer semestre del 2007, períodos que comprendieron la preparación del material inicial hasta la encapsulación y germinación de los SE.

## Material inicial

El material inicial correspondió a SE de *N. alpina* cultivados en condiciones axénicas, obtenidos desde masas proembriónicas (MPEs) de la línea embriónica RaC01 (Raulí, explanto Cotiledonar, Clon 01). De acuerdo a protocolos establecidos para la especie, a partir de callos embriogénicos (**Figura 1A**) se estimula la regeneración continua de MPEs. (**Figura 1B**), desde donde se aíslan los embriones somáticos a encapsular en un estado de desarrollo torpedo-cotiledonar, con una longitud de 3 a 4 mm aproximadamente (**Figura 1C**) (Castellanos *et al.*, 2005).



MPE: masas proembriónicas

**Figura 1. Embriogénesis somática en *Nothofagus alpina*. A) Callo embriogénico después de 16 semanas; flechas indican embrión somático en estado cotiledonar (barra = 5 mm); B) MPE con múltiples regiones embriogénicas; C) MPE con al menos 15 embriones somáticos en estado cotiledonar y torpedo (barra = 5 mm).**

**Figure 1. Somatic embryogenesis in *Nothofagus alpina*. A) Embryogenic callus after 16 wk; arrows indicate somatic embryo in cotyledonary stage (bar = 5 mm); B) MPE with multiple embryogenic regions; C) MPE with at least 15 somatic embryos in cotyledonary and torpedo stages (bar = 5 mm).**

## Componentes de la matriz artificial

El endosperma sintético o matriz artificial estuvo compuesta de minerales y vitaminas del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (IAA), 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (NAA), 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), además de Fe-EDTA y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Dependiendo del tratamiento de encapsulado aplicado, el agar se reemplazó por alginato de sodio al 4% (E1), 3% (E2) y 2% (E3), según plantean Prewein y Wilhelm (2002), Ipekei y Gozukirmizi (2003) y Maruyama *et al.* (2003), respectivamente. Por su parte, el acomplejamiento de las cápsulas se efectuó mediante inmersión en cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) a diferentes concentraciones y determinados intervalos de tiempo (**Cuadro 1**). Para concluir se realizó un lavado en agua estéril durante 40 min.

**Cuadro 1. Componentes de la matriz artificial utilizados en el proceso de encapsulado de embriones somáticos y cigóticos.**

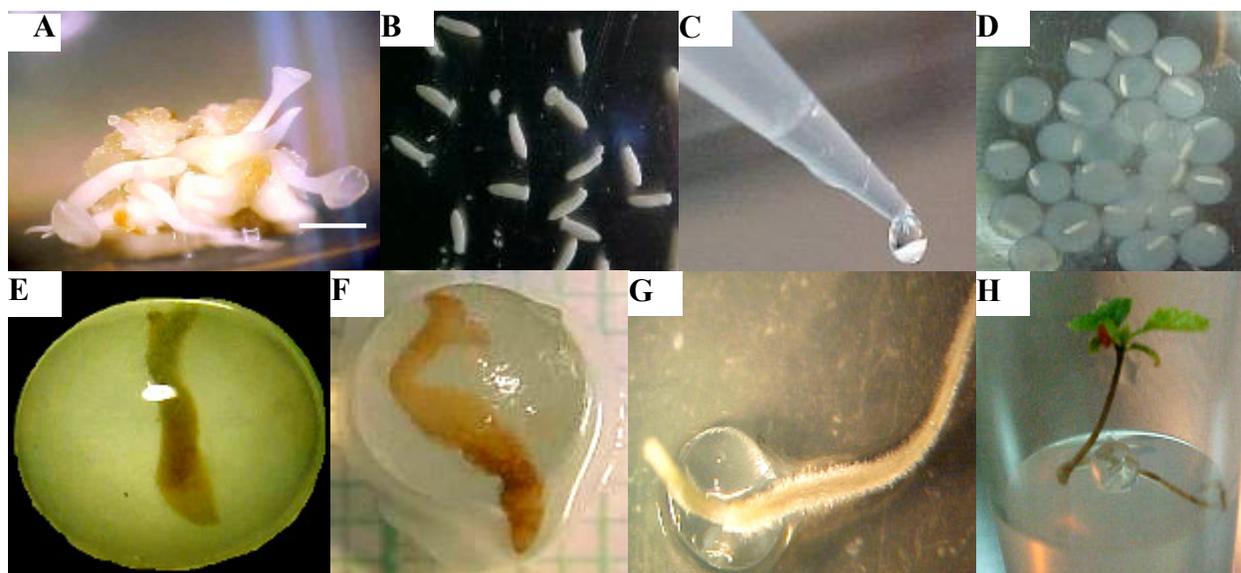
**Table 1. Components of the artificial endosperm used in process of encapsulating of somatic and zygotic embryos.**

Tratamientos	Alginato de sodio	CaCl <sub>2</sub>	Tiempo
	%	g L <sup>-1</sup>	min
E1	4	15,0	10
E2	3	5,5	30
E3	2	14,0	30

E1: encapsulado tipo 1, alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 15 g L<sup>-1</sup> por 10 min; E2: encapsulado tipo 2, sodio al 3% e inmersión en cloruro de calcio 5,5 g L<sup>-1</sup> por 30 min; E3: encapsulado tipo 3, sodio al 2% e inmersión en cloruro de calcio 14 g L<sup>-1</sup> por 30 min.

**Encapsulado de embriones somáticos**

Los embriones somáticos aislados a partir de las masas proembriónicas (**Figura 2A**) se sumergieron en una solución de alginato de sodio (gel), según el tipo de encapsulado aplicado, posteriormente se succionaron mediante una micropipeta (**Figura 2C**) para dar origen a la cápsula protectora. Luego, con el fin de sellar las cápsulas, se sumergieron en una solución acomplejante de CaCl<sub>2</sub> por un tiempo determinado (**Cuadro 1**) seguido de un lavado en agua estéril por 40 min (**Figura 2D**). Todo este proceso se realizó bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar con previa esterilización del material y medios de cultivo (matriz). Finalmente, las semillas artificiales se cultivaron en un medio de germinación dispuesto en placas Petri con macro y micronutrientes del medio MS suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g L<sup>-1</sup> de agar-agar. De esta manera se dejaron en cámara de cultivo a una temperatura de 25 ± 1 °C en ausencia de luz.



**Figura 2.** Encapsulación de embriones somáticos y cigóticos. A) Masas proembriogénicas con embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo (barra = 2 mm); B) embriones cigóticos de *Nothofagus alpina*; C) encapsulado de embrión somático a través de una micropipeta con alginato sodio; D) semillas artificiales en enjuague con agua estéril durante 40 min; E) supervivencia de embrión somático encapsulado al cabo de 21 días; F) elongación de embrión somático encapsulado en alginato de sodio al 4%; G) germinación de embrión cigótico encapsulado en alginato de sodio al 4% al cabo de 5 días; H) conversión de embrión cigótico encapsulado a planta al cabo de 14 días.

**Figure 2.** Encapsulated of somatic and zygotic embryos. A) Proembryogenic mass with somatic embryos in different development stages (bar = 2 mm); B) zygotic embryos of *Nothofagus alpina*; C) encapsulated of somatic embryo across micropipette with sodium alginate; D) artificial seeds in rinsing with sterile water during 40 min; E) survival of somatic embryo encapsulated after 21 d; F) elongation of somatic embryo encapsulated in sodium alginate at 4%; G) germination of zygotic embryo encapsulated in sodium alginate at 4% after 5 d; H) conversion of encapsulated zygotic embryo to plant after 14 d.

### Encapsulado de embriones cigóticos

Se realizó un remojo previo de las semillas de *N. alpina* durante 48 h en agua corriente, luego se efectuó una desinfección superficial que consistió en sumergir las semillas en una solución de etanol al 70% (v/v) por 5 min, seguido de un lavado en agua estéril por 3 min. Posteriormente, éstas se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio comercial diluido al 50% (v/v) seguido de tres lavados en agua estéril por 3, 4 y 5 min, respectivamente. Este proceso se realizó en agitación constante y en cámara de flujo laminar. Luego se removieron los tejidos protectores de la semilla bajo una lupa estereoscópica con la ayuda de pinzas y bisturí estériles. De esta manera se obtuvieron los embriones desnudos listos para proceder a su encapsulación (**Figura 2B**). El proceso de encapsulado fue igual al aplicado a los embriones somáticos (**Cuadro 1**). Finalmente, las semillas artificiales se cultivaron en medio de germinación dispuesto en

placas Petri con macro y micronutrientes del medio MS suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g L<sup>-1</sup> de agar-agar, las cuales se dejaron en cámara de cultivo a una temperatura de 25 ± 1 °C en ausencia de luz. Una vez que germinaron las semillas sintéticas se transfirieron a luz, con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad) dentro de la misma cámara de crecimiento.

### **Variables evaluadas**

Al cabo de 3 semanas en oscuridad se evaluó el porcentaje de embriones somáticos encapsulados que presentaron elongación de eje hipocotilo-raíz y supervivencia. Posteriormente, a las 4 semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de germinación de los embriones somáticos encapsulados. El criterio utilizado para evaluar la germinación de los embrioides encapsulados fue la emergencia de la raíz desde la cápsula artificial.

Se evaluó el porcentaje supervivencia que presentaron los embriones cigóticos encapsulados y con una frecuencia de 4 días se evaluó el porcentaje de germinación alcanzado, tomando como criterio la emergencia de la raíz desde la cápsula.

### **Diseño experimental**

El diseño se orientó a determinar el mejor comportamiento germinativo de los embriones somáticos encapsulados en diferentes matrices artificiales. Para lo anterior se evaluaron tres procedimientos de encapsulado (E1, E2 y E3), con tres repeticiones cada uno. La unidad experimental correspondió a una placa Petri con seis semillas artificiales, generando 18 semillas por tipo de encapsulado.

Los datos obtenidos en porcentaje se sometieron a transformación arcoseno de la raíz cuadrada previo al análisis. De esta manera, los efectos de los tratamientos se evaluaron mediante ANDEVA con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05. Cuando existieron diferencias significativas entre los tratamientos se llevó a cabo la prueba de diferencia mínima significativa de medias (DMS), para este fin se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

Para determinar el comportamiento de los embriones cigóticos y somáticos encapsulados se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio con tres tratamientos y cuatro repeticiones cada uno. La unidad experimental (placa Petri) estuvo conformada de seis cápsulas generando un total de 24 semillas artificiales por tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de elongación del eje hipocótilo-raíz y supervivencia de los embriones somáticos encapsulados al cabo de 21 días (**Figura 2E y 2F**) fueron superiores en un 70 y 90%, respectivamente, en todos los tratamientos aplicados (**Cuadro 2**). Además, no existieron diferencias significativas en los diferentes porcentajes de alginato de sodio utilizado y tiempo de acomplejamiento en  $\text{CaCl}_2$  en las variables antes mencionadas. Sin embargo, se presentó una respuesta similar a la lograda por autores como Castillo *et al.* (1998), quienes observaron un mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos encapsulados a medida que se aumentó el contenido de alginato de sodio y se redujo el tiempo de exposición al  $\text{CaCl}_2$  (Prewein y Wilhelm, 2002; Malabadi y Van Staden, 2005). Esto se debe a que altas concentraciones o una excesiva exposición de los embriones al agente acomplejante ( $\text{CaCl}_2$ ) ocasiona una mayor adsorción y penetración del  $\text{CaCl}_2$  al embrión, lo cual puede generar una inhibición del crecimiento que se ve reflejado en una disminución en la respuesta germinativa y por ende posterior desarrollo en campo (Redenbaugh *et al.*, 1986; Malabadi y Van Staden, 2005).

### **Cuadro 2 Efecto de los diferentes tratamientos de encapsulado aplicado a embriones somáticos de *Nothofagus alpina*.**

**Table 2. Effect of different treatments of encapsulating applied to somatic embryos of *Nothofagus alpina*.**

Tratamientos	Supervivencia	Elongación eje hipocotilo-raíz	Germinación
		%	
E1	99a	83a	45a
E2	97a	79a	31a
E3	99a	74a	35a

E1: encapsulado tipo 1, alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio  $15 \text{ g L}^{-1}$  por 10 min; E2: encapsulado tipo 2, sodio al 3% e inmersión en cloruro de calcio  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  por 30 min; E3: encapsulado tipo 3, sodio al 2% e inmersión en cloruro de calcio  $14 \text{ g L}^{-1}$  por 30 min.

Medias seguidas por igual letra en las columnas no difieren significativamente entre sí según prueba de Diferencia Mínima Significativa ( $P > 0,1$ ).

Cabe señalar la importancia del alto porcentaje de supervivencia y germinación obtenido en el encapsulado de los embriones cigóticos (**Cuadro 3**). De estos resultados se desprende que si el embrión alcanza el vigor necesario durante la fase de maduración, puede romper la resistencia mecánica y falta de oxígeno que proporciona la cápsula al aumentar el contenido de alginato de sodio en la matriz y así no afectar la respuesta germinativa (Jiménez y Quiala, 1998). Esto se puede extrapolar a los embriones somáticos, afinando los protocolos de maduración para obtener mejores porcentajes de germinación de las semillas artificiales (Nieves *et al.*, 2001).

**Cuadro 3. Efecto de los diferentes tratamientos de encapsulado aplicado a embriones cigóticos de *Nothofagus alpina*.**

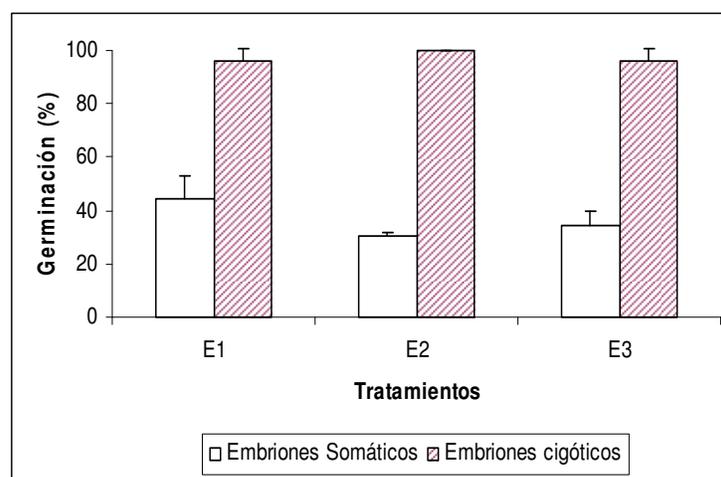
**Table 3. Effect of different treatments of encapsulating applied to zygotic embryos of *Nothofagus alpina*.**

Tratamientos	Supervivencia	Germinación
	%	
E1	100a	95,8a
E2	100a	100,0a
E3	100a	95,8a

E1: encapsulado tipo 1, alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 15 g L<sup>-1</sup> por 10 min; E2: encapsulado tipo 2, sodio al 3% e inmersión en cloruro de calcio 5,5 g L<sup>-1</sup> por 30 min; E3: encapsulado tipo 3, sodio al 2% e inmersión en cloruro de calcio 14 g L<sup>-1</sup> por 30 min.

Medias seguidas por igual letra en las columnas no difieren significativamente entre sí según prueba de Diferencia Mínima Significativa ( $P > 0,1$ ).

Al comparar el comportamiento germinativo de los embriones somáticos y cigóticos encapsulados se puede observar que ambos tipos de embriones tienen similar comportamiento según el tratamiento de encapsulado aplicado (E1, E2 y E3). Sin embargo, los embriones cigóticos superan ampliamente los niveles de germinación (100% para E2) alcanzados por los embriones somáticos (44% para E1) (**Figura 3**). Algunos autores señalan que la germinación de ES es afectada por el grado de vigor o madurez que presentan los embriones al momento de ser encapsulados (Gómez, 1998; Nieves *et al.*, 2001), ya que la resistencia mecánica que ofrece un encapsulado excesivamente duro ocasiona que gran parte de la energía disponible sea utilizada en el rompimiento del endosperma sintético (Jiménez y Quiala, 1998).



E1: encapsulado tipo 1, alginato de sodio al 4% e inmersión en cloruro de calcio 15 g L<sup>-1</sup> por 10 min; E2: encapsulado tipo 2, sodio al 3% e inmersión en cloruro de calcio 5,5 g L<sup>-1</sup> por 30 min; E3: encapsulado tipo 3, sodio al 2% e inmersión en cloruro de calcio 14 g L<sup>-1</sup> por 30 min.

Valores con igual letra no difieren significativamente entre sí según prueba de Diferencia Mínima Significativa ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 3. Comparación del porcentaje de embriones cigóticos encapsulados germinados vs. porcentaje de embriones somáticos encapsulados germinados.**

**Figure 3. Comparison of germination percentage of encapsulated zygotic embryos vs. encapsulated somatic embryos.**

Es importante señalar que los embriones cigóticos germinaron a los 4 días de cultivo (**Figura 2G**), logrando la conversión a planta (**Figura 2H**), mientras que los somáticos lo hicieron al cabo de 4 semanas aproximadamente y en forma irregular, lo que pone de manifiesto la falta de madurez y asincronía en el desarrollo de estos embrioides (Castellanos *et al.*, 2004). Sin embargo, el perfeccionamiento del proceso de encapsulado para embriones somáticos, con el fin de mejorar los porcentajes de germinación y posterior conversión a planta, puede significar la generación de un producto clonal con potencial para superar a la semilla de origen sexual (Tapia *et al.*, 1999; Nieves *et al.*, 2001).

### CONCLUSIONES

El procedimiento de encapsulado se puede aplicar en ambos tipos de embriones, somáticos y cigóticos de *N. alpina*, permitiendo la normal germinación de los embriones.

No se aprecian diferencias significativas en el porcentaje de germinación alcanzado para embriones somáticos y cigóticos según el porcentaje de alginato de sodio (2%, 3% y 4%) y tiempo de exposición al agente complejante cloruro de calcio.

Los más altos niveles de germinación fueron alcanzados por los embriones cigóticos en comparación con los embriones somáticos, debido principalmente a la falta de madurez y asincronía de los embrioides.

## LITERATURA CITADA

Burschel, P., C. Gallegos, O. Martínez, y W. Moll. 1976. Composición y dinámica regenerativa de un bosque virgen mixto de raulí y coigüe. Universidad Austral de Chile, Valdivia. *Bosques (Chile)* 1:55-74.

Castellanos, H., M. Sánchez-Olate, y D. Ríos. 2004. Embriogénesis somática recurrente en raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.). 36 p. *In* Segundo Congreso Chileno de Ciencias Forestales, Valdivia, Chile. 10-12 de noviembre. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Castellanos, H., M. Sánchez-Olate, y D. Ríos. 2005. La embriogénesis somática como alternativa para la regeneración *in vitro* de raulí y roble. p. 59-74. *In* B. Gutiérrez *et al.* (eds.) Clonación de raulí: estado actual y perspectivas. Instituto Forestal (INFOR), Centro de Producción y Experimentación Forestal (CEFOR S.A.), Universidad Austral de Chile, Fondo de Desarrollo e Innovación y Corporación de Fomento de la Producción (FDI-CORFO), Concepción, Chile.

Castillo, B., M.A.L. Smith, and U.L. Yadava. 1998. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Rep.* 17:172-176.

CONAF. 2008. Ley de Recuperación del Bosque Nativo y Fomento Forestal. Corporación Nacional Forestal (CONAF), Santiago, Chile. Disponible en <http://www.conaf.cl/> (Leído el 10 de julio del 2008).

Donoso, C., y A. Lara. 1999. Silvicultura de los bosques nativos de Chile. 420 p. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Fuji, J.A., D.T. Slade, K. Redenbaugh, and K.A. Walker. 1987. Artificial seeds for plant propagation. *Trends Biotechnol.* 5:335-339.

Gómez, R. 1998. Embriogénesis somática. p. 57-79. *In* J.N. Pérez (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

González, O., J. Silva, y A. Espinosa. 2004. Semilla artificial: una solución en la biodiversidad mundial. p. 17-22. *In* E. Galante (ed.) Cuadernos de Biodiversidad N° 15. Centro Iberoamericano de Biodiversidad (CIBIO), Universidad de Alicante, Alicante. España.

Guerra, M.P., L.L. Dal Vesco, J.P.H. Ducroquet, R.O. Nodari, and M.S. Reis. 2001. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13:117-128.

INFOR-CORFO. 1997. Boletín Estadístico. Estadísticas Forestales. Instituto Forestal (INFOR) y Corporación de Fomento de la Producción (CORFO), Santiago, Chile.

Ipekei, Z., y N. Gozukirmizi. 2003. Cell biology and morphogenesis. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep.* 22:16-24.

Jiménez, E., y E. Quiala. 1998. Semilla artificial. p. 225-240. *In* J.N. Pérez (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Kumar, M., V. Vakeswaran, and V. Krishnasamy. 2004. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81:97-100.

Lara, A., C. Donoso, y J.C. Aravena. 1996. La conservación del bosque nativo de Chile : Problemas y desafíos. p. 335-361. *In* Armesto, J.J., C. Villagrán, y M.K. Arroyo (eds.) Ecología de los bosques nativos de Chile. Comité de Publicaciones Científicas, Vicerrectoría Académica, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Loewe, V., M. Toral, G. Freitte, M. Camelio, M. Mery, C. López, y E. Urquieta. 1997. Monografía del raulí. *Nothofagus alpina*. Corporación Nacional Forestal (CONAF), Instituto Forestal (INFOR) y Fondo de Innovación Agraria (FIA), Santiago, Chile.

Malabadi R., and J. Van Staden. 2005. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 82:259-265.

Maruyama, E., Y. Hosoi, and K. Ishii. 2003. Somatic embryo culture for propagation, artificial seed production, and conservation of sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sib. et Zucc.). *J. For. Res.* 8:1-8.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nieves, N., J. Lorenzo, M. Blanco, J. González, R. Tapia, y A. González. 2001. Composición de un endospermo artificial para embriones de mandarina “Cleopatra” (*Citrus reshni* Hort es Tan). *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 27:11-15.

Nieves, N., Y. Zambrano, R. Tapia, M. Cid, D. Pina, and R. Castillo. 2003. Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 75:279-282.

Patel, A.V., I. Pusch, G. Mix-Wagner, and K.D. Vorlop. 2000. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Rep.* 19:868-874.

Prewein, C., and E. Wilhelm. 2002. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 39:613-617.

Redenbaugh, K., B.D. Paasch, J.W. Nichol, M.E. Kossler, P.R. Viss, and K.A. Walker. 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio-Technol.* 4:797-801.

Sánchez-Olate, M., D. Ríos, y L. Mardones. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. 51 p. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Departamento de Silvicultura, Concepción, Chile.

SAS Institute. 2002. SAS® User’s guide: Statistics. Version 9.0. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

Tapia, R., R. Castillo, N. Nieves, M. Blanco, J. González, M. Sánchez, y Y. Rodríguez. 1999. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) var. Cp 5243. *Biotecnología Aplicada* 16(1):20-23.

Utomo, H.S., I. Wenefrida, M.M. Meche, and J.L. Nash. 2008. Synthetic seed as a potential direct delivery system of mass produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92:281-291.