

PERSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGIA EN LAS ECOTECNOLOGIAS

RESUMEN

Las ecotecnologías se basan en el diseño de ecosistemas para beneficio del hombre y los sistemas naturales, por tanto buscan crear tecnologías que reduzcan los efectos nocivos al medio ambiente. La biotecnología presenta una serie de herramientas que podrían ser compatibles con este mínimo impacto a la naturaleza.

PALABRAS CLAVES: tecnologías ecológicas, ecoingeniería, ingeniería ecológica, biotecnología ambiental, biología molecular, cultivos *in vitro*, recursos fitogenéticos.

ABSTRACT

Ecotechnologies are based on ecosystems design for benefit of man and natural systems, therefore it looks for to create technologies that reduce the injurious effects to environment. The biotechnology presents tools that could be compatible with this minimum impact to the nature.

KEYWORDS: ecological technologies, eco-engineering, ecological engineering, environmental biotechnology, molecular biology, *in vitro* tissue culture, fitogenetic recourses

LUIS GONZAGA GUTIERREZ L.

Biólogo Ph.D

Profesor asociado

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Grupo de Biodiversidad y Biotecnología

Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad Tecnológica de Pereira

1. INTRODUCCIÓN

Definida como cualquier técnica que utilice organismos vivos para hacer o modificar un producto, para mejorar plantas y animales, o para desarrollar microorganismos de uso específico. La biotecnología hace hoy posible el estudio y la manipulación de organismos a nivel celular y molecular. Y ante la demanda creciente de tecnologías para la descontaminación, las técnicas biotecnológicas se utilizan cada vez más como las tecnologías ecológicas más idóneas, teniendo gran potencial para solucionar muchos otros problemas ambientales. Se prevé que se aplique al tratamiento del agua y de los desechos sólidos (incluidos los plásticos biodegradables), la biominería, la agricultura (la obtención de plantas resistentes a las condiciones ambientales más adversas) y la lucha contra la desertificación, y que se convierta en "la piedra angular de la producción menos contaminante" (1).

Sin embargo aunque el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), le otorgue a la biotecnología un papel tan preponderante en las llamadas tecnologías ecológicas, no todos piensan lo mismo. En su libro sobre ingeniería ecológica, (2) afirman que "la ingeniería ecológica y la ecotecnología no deberían confundirse con bioingeniería y biotecnología... Pues la biotecnología, involucra la manipulación de las estructuras genéticas de las células para producir nuevos genomas y organismos capaces de llevar a cabo determinadas funciones. Y que en contraste la

ecotecnología no manipula a nivel genético, sino que considera la articulación de las especies y su medio ambiente abiótico como un sistema de autodiseño que puede adaptarse a los cambios del medio externo...".

¿Qué son entonces las ecotecnologías que parecen no compaginar bien con las biotecnologías? Para (3), son "el uso de medios tecnológicos para el manejo de los ecosistemas, basados en un conocimiento profundo de los principios en los cuales se fundamentan los sistemas ecológicos naturales y la transferencia de este conocimiento hacia el manejo de los mismos en forma tal que los daños causados al ambiente sean minimizados". Por tanto, las tecnologías ecológicas y la ecoingeniería al igual que otras ingenierías, son la práctica, la aplicación de una ciencia natural en el diseño, creación y manejo de sus sistemas deseados y necesarios para la humanidad, pero difiere de otras ramas de la ingeniería en que descansa en los ecosistemas como base para el diseño (4).

En aras del mínimo impacto ¿cuáles son las biotecnologías que pueden ser más compatibles o amigables con el medio ambiente ?.

Este artículo tiene como propósito la descripción y discusión de la principales técnicas biotecnológicas que pueden ser incluidas dentro de la "caja de herramientas" de las modernas ecotecnologías.

2. EN BIOTECNOLOGÍA NO TODO ES TRANSGÉNICO

Modernamente a la biotecnología se la puede dividir en dos grandes ramas, la biotecnología celular y la ingeniería genética.

Sin lugar a dudas la ingeniería genética (IG) constituye una poderosa herramienta a la hora de obtener organismos mejorados ya que, consiste en técnicas y protocolos, que permiten aislar un gen (o secuencias concretas de ADN), reproducirlo en grandes cantidades dentro o fuera de la célula, analizarlo, modificarlo y reinsertarlo dentro de un organismo, modificando por tanto la constitución genética de un organismo. Así pues, la IG es la base para la obtención de organismos genéticamente modificados (OGM), entre dichos organismos podemos mencionar, plantas, animales y microorganismos genéticamente modificados. Es importante destacar que, debido a que la tecnología de los transgénicos emplea vectores de ADN (obtenidos por ADN recombinante) para llevar la información de un genoma a otro, la multiplicación de dichos vectores (fagos, plásmidos, cósmidos, YACs) se realiza en organismos unicelulares (bacterias, levaduras) y por tanto, antes que una planta o un animal resulten transgénicos, se debe transformar primero el microbio donde se multiplicó el casete o vector (5), (6).

Por lo tanto si tomamos en cuenta tanto las aseveraciones de (2) y (3) tendríamos que probablemente el empleo de ingeniería genética aplicada a las ecotecnologías podría alterar los ecosistemas, a partir de la transformación de organismos. Ya que existen dudas respecto de los riesgos ambientales que puede suponer la tecnología del ADN recombinante en la obtención de nuevas sepas, dado que cabe la posibilidad de que los genes de estas especies modificadas genéticamente se transfieran a organismos naturales (1), (7).

Pero en biotecnología no todo es transformación de organismos. Hay otra rama, las biotecnologías celulares, en las cuales no necesariamente se manipula el genoma. De hecho la biotecnología ambiental se especializa en la aplicación de los procesos biológicos modernos para la protección y restauración de la calidad del ambiente. Se sabe que desde el siglo XIX se han venido empleando microorganismos en procesos ambientales. Y estos bioprocesos emplean dichos microorganismos con criterios de selección, es decir, se realizan cultivos microbiológicos con los cuales se ensayan determinadas condiciones ambientales deletéreas (bioensayos), a las que deben sobrevivir algunas sepas que serán empleadas después cómo organismos idóneos para la restauración ecológica. Así los microbios pueden ser seleccionados de los mismos ecosistemas que se van a restaurar y de esta manera los daños causados al ambiente pueden ser minimizados.

Sin embargo cuando se trata de mover microorganismos de ecosistema a otro, se debe tener en cuenta la posibilidad de la transferencia génica horizontal, que implica que en las bacterias, los genes pueden pasar de unas a otras, siendo este fenómeno más frecuente de lo que se piensa (8). Aún más, la información disponible sugiere que se ha producido transferencia génica de bacterias a eucariotas, de bacterias a arqueas y especialmente de eucariotas a bacterias. Por lo tanto para soltar microorganismos a la naturaleza "sin miedo", resulta imprescindible conocer las condiciones que estimulan a las bacterias específicas transferir sus genes a otros organismos. Con este tipo de información los biólogos podrían seleccionar bacterias que tuviesen menos probabilidad de intercambiar genes con otros organismos allá donde se aplicaran. Por ejemplo, si han de soltarse en un lago, habría que emplear bacterias que no intercambiaran genes en el agua (8).

3. PRINCIPALES BIOPROCESOS DE LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

En la actualidad, el principal uso de la biotecnología ambiental es descontaminar o paliar la contaminación. Uno de las primeras aplicaciones fue la depuración de aguas residuales, seguida de la depuración de aire y efluentes gaseosos. Sin embargo la biorehabilitación o biorremediación está pasando a concentrarse cada vez más en la depuración de los suelos y los desechos sólidos. El suelo puede contaminarse con agentes orgánicos (derrames de plantas químicas, instalaciones de gas y otras instalaciones manufactureras) y con agentes inorgánicos (metales pesados y aniones, como el sulfato). La biotecnología es muy eficaz para combatir la contaminación por agentes orgánicos: los microorganismos utilizan los contaminantes como fuentes de alimentos o energía, y convierten al agente contaminante en biomasa bacteriana. Este es el caso de la biodesulfuración del petróleo y del carbón, en la cual se elimina el azufre de los combustibles fósiles. Varios microorganismos pueden extraer el azufre de piritita del carbón. La biotecnología también ofrece la posibilidad de reducir las emisiones de metano en varias etapas del ciclo de combustible del carbón (1).

Teniendo en cuenta el posible impacto causado por los microorganismos al ser cambiados de un ambiente a otro (transferencia génica horizontal). Es posible utilizar en lugar del organismo completo, sus biocatalizadores o enzimas, las cuales intervendrán igual en los procesos biodegradativos aerobios y anaerobios. La inmovilización enzimática consiste en la extracción y fijación de las enzimas a un soporte. Este proceso permite la neutralización de las enzimas, bien sea en forma discontinua, unidas a un reactor. O en forma continua fijándolas a una columna por donde pasa el sustrato, produciéndose la reacción enzimática. La inmovilización se lleva a cabo mediante diferentes metodologías

adaptadas a procesos industrializables: atrapamiento de geles, microencapsulación, reticulado con reactivos bifuncionales, adsorción y unión covalente a soportes orgánicos e inorgánicos (9). Algunas ecotecnologías podrían basarse así en biotratamientos por inmovilización de biocatalizadores, aplicados a determinados ecosistemas, en los cuales los soportes orgánicos se mimeticen con el ambiente, suavizando el impacto al medio. Tiene la ventaja adicional que si las enzimas provienen de organismos extremófilos (los cuales pueden medrar en ambientes muy ácidos o básicos, en altas temperaturas, extrema salinidad, frío o presión) (10), sus extremoenzimas pueden ser inmovilizadas, sin que con esto se esté arriesgando el ecosistema receptor con una ganancia de genes no deseados. Igual se podría decir de aquellas enzimas que provengan de microorganismos genéticamente modificados.

De otra parte, los biotratamientos emplean microorganismos que llevan a cabo la degradación de las sustancias contaminantes del vertido, normalmente mediante procesos oxidativos. El biotratamiento del agua generalmente significa liberarla de cualquier impureza que contenga, entre ellos residuos líquidos, lo cual implica procesos en los cuales se utilizan organismos unicelulares anaerobios y aerobios. Prácticamente todas las sustancias son biodegradables, pero a la hora de elegir un tratamiento biológico, lo importante es estudiar si la velocidad de degradación de las sustancias contaminantes presentes en el vertido residual es lo suficientemente elevada como para que el proceso resulte eficaz (11). En general todos los biotratamientos son susceptibles de abordarse mediante inmovilización de microorganismos y de biocatalizadores, con lo cual debidamente insertados en los ecosistemas que se diseñen vendrían a ser parte de las tecnologías ecológicas.

En la biominería, los procesos de tratamiento biológico se utilizan para eliminar el cianuro y los metales del agua de las minas, mientras que se han utilizado los microorganismos para eliminar la toxicidad de soluciones separando los metales pesados, y para recobrar metales preciosos de los desechos industriales (1).

Entre los principales procesos biotecnológicos utilizados en el tratamiento del aire y de los efluentes gaseosos tenemos: la biofiltración: proceso en el cual los microorganismos inmovilizados, adheridos a una matriz orgánica (como abono natural o corteza) degradan a los agentes contaminantes gaseosos. La principal función de los biofiltros es la reducción de los olores desagradables y el tratamiento de los solventes orgánicos volátiles. También se utilizan para eliminar compuestos fácilmente biodegradables emitidos por el fraccionamiento del petróleo y efluentes gaseosos de los sectores petroquímicos, alimentario y de producción de piensos, reemplazado a las técnicas de tratamiento físico o químico del aire (1); la biodepuración: en la cual los

agentes contaminantes se eliminan mediante el lavado con un fluido con células en suspensión, el cual se regenera por actividad microbiana en un tanque aireado. En la velocidad de degradación influyen varios factores: el tipo de microorganismos que se va a emplear en la biodepuración y el rendimiento que éstos aseguran (9); la biopercolación: en la cual microorganismos unidos a una matriz inerte degradan agentes contaminantes suspendidos en una película de agua, y reciben los nutrientes inorgánicos por un mecanismo de precolación a través del dispositivo (1). Tanto la biofiltración, la biodepuración y la biopercolación vienen a contribuir con la ecotecnología en el sentido que evitan el vertimiento de contaminantes a los ecosistemas, pues se trata del tipo de biotecnologías ambientales denominadas "antes del tubo".

4. LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS Y LAS ECOTECNOLOGIAS

Se entiende por recursos fitogenéticos el acervo de plantas que garantizan la seguridad alimentaria del ser humano y de los animales domesticados. Y la multiplicidad de los usos de las plantas depende de una característica crucial de la vida de las mismas, su diversidad. La diversidad se verifica en tres niveles principales: las combinaciones de las especies que forman ecosistemas distintos, el número de las especies diferentes, y las diversas combinaciones de géneros en las especies (12)

Para la conservación de la diversidad de los recursos genéticos es necesario el empleo de herramientas que la biotecnología puede brindar, importantemente se destacan la micropropagación y la biología molecular.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* o micropropagación es un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. Constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. A partir de los avances alcanzados en la regeneración de plantas *in vitro* se ha desarrollado toda una industria de micropropagación, la cual está compuesta por cerca de 600 compañías en el mundo con una producción de 500 millones de vitropiantas al año (13).

El cultivo de tejidos *in vitro* está basado en el principio de la totipotencia celular, es decir la capacidad que tienen las células de regenerar el organismo completo al cual pertenecen. Por tanto, se trata de unos procedimientos que permiten la clonación de los genomas de individuos seleccionados. Y aunque es pieza fundamental para el logro de las plantas transgénicas, ya que sin técnicas eficientes de micropropagación no es posible la obtención de transgénesis vegetal por ingeniería genética,

esta biotecnología celular, permite a partir de la selección agronómica, de bioensayos o de biología molecular, la obtención de plantas que sean eficientes en la restauración de los ecosistemas que diseñan las ecotecnologías.

Según (13), las principales ventajas de este sistema de propagación se pueden resumir en: altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos periodos de tiempo; introducción rápida de nuevas variedades o clones; producción independiente de las condiciones ambientales; incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento; uniformidad en las plantas producidas y mayor facilidad en la comercialización.

Las vías de regeneración de plantas son de dos tipos: la organogénesis, es decir, la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces. La otra vía regenerativa es la embriogénesis somática, en la cual se consigue desarrollar embriones somáticos, asexuales o adventicios, los cuales no son el producto de la fusión de gametos (fecundación de óvulos con granulos de polen). Esta última técnica es señalada como la más promisoría a la hora de obtener producción masiva de plantas (14), (15).

Cuando se micropropaga una especie (por organogénesis o por embriogénesis), esto no implica la transformación del genoma, pues al clonar un genotipo determinado, se obtienen individuos con una variación genética similar a la que se produce en la naturaleza mediante la propagación vegetativa. Por tanto, en principio, se pueden seleccionar individuos dentro de un ecosistema, los cuales realicen allí determinada función ecológica, que puedan ser empleados para ecorrestauración, multiplicarlos mediante micropropagación elevando la eficiencia del ecosistema para determinados procesos biológicos. Si dichos individuos son tomados del mismo ecosistema, el impacto en el diseño del proceso sería minimizado para el ecosistema y por tanto podría catalogarse como tecnología ecológica. Como ejemplo de esto tenemos la propagación *in vitro* de *Phragmites australis* vía embriogénesis somática (16). Dicha macrófita es utilizada en la depuración del agua en humedales tanto naturales como artificiales. Así en el diseño ecotecnológico de humedales para la purificación de aguas residuales se concibió la idea de multiplicar clones de *P. Australis* pues la extensión del humedal requería de grandes cantidades de esta especie y la recolección de la misma de otros ecosistemas no es lo más aconsejable (por la afectación que se le puede causar al ecosistema donante). Por tanto el cultivo de tejidos *in*

vitro puede jugar un papel importante, en el diseño de soluciones en fitorremediación, es decir, en el empleo de organismos vegetales para propósitos de restauración ecológica.

Sin embargo, existen dos limitaciones importantes con respecto al cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como herramienta ecotecnológica. La primera de ellas es que no todas las especies vegetales responden bien a la micropropagación, pues dependiendo del tejido empleado para la inducción puede aparecer recalcitrancia, es decir, falta de respuesta para el establecimiento *in vitro*. La otra desventaja implica la baja variabilidad genética que se origina al introducir unos pocos clones en un ecosistema. Aún si se multiplican más rápido que de manera natural, la ventaja de la naturaleza es que con la recombinación genética, es decir la reproducción sexual entre individuos, se mantiene o hasta se incrementa la diversidad biológica. Por ende, es importante evaluar el impacto que causará la introducción de unos pocos individuos con gran eficiencia para la fitorremediación, pero que introducen al ecosistema baja variabilidad genética.

5. LA BIOLOGÍA MOLECULAR COMO HERRAMIENTA DE SELECCIÓN

La biología molecular es la parte de la bioquímica que estudia las proteínas y los ácidos nucleicos. Entre las aplicaciones tecnológicas que se desprenden de la biología molecular sobresalen la ingeniería genética y los marcadores moleculares (17).

Un marcador genético es cualquier diferencia detectable por distintos medios, controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético. (18). Existen dos clases de marcadores genéticos: morfológicos y moleculares. Los marcadores fenotípicos o morfológicos, tienen muchas limitaciones, pues su expresión está sujeta a las variaciones del medio ambiente, e incluso, algunas de las características morfológicas tienen efectos indeseables. Con frecuencia este tipo de marcadores sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su edad adulta. Además interactúan epistáticamente, limitando el número de marcadores que pueden utilizarse de forma inequívoca en una población segregante (19). En contraste, los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros y presentan un mayor polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo, usando toda la planta o sólo parte de ella. Aparentemente están libres de efectos epistáticos y virtualmente se puede evaluar un número ilimitado de ellos (19).

Dentro de los marcadores moleculares se incluyen los basados en Southern (e.g. RFLPs), los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (e.g.

RAPDs), y los basados en ambos métodos (e.g. AFLPs) (19). El resultado observable del empleo de cualquier tipo de marcadores es un patrón de bandas (o de picos cuando se obtiene con secuenciadores automáticos). Cada banda corresponde a la posición de un fragmento de ADN separado previamente en función de su tamaño por medio de la electroforesis en una matriz porosa, habitualmente un gel de agarosa o acrilamida. La hipótesis de partida es que cada banda corresponde a un alelo de un locus determinado. Si el marcador estudiado es codominante, el heterocigoto muestra dos bandas que se corresponden con las que presentan, en una u otra posición, los respectivos homocigotos. Si el marcador es dominante, sólo existen dos fenotipos: el que presenta una banda y el que no la tiene. La presencia de banda es lógicamente dominante sobre su ausencia (20).

La ecotecnología podría ayudarse de los marcadores moleculares de dos formas: utilizándolos como herramienta para medir la diversidad biológica de poblaciones en los ecosistemas o bien, empleándolos para seleccionar genotipos y poblaciones con determinadas características, tales como resistencia a condiciones ambientales adversas, habilidad para procesos de fitorehabilitación, etc.

Los marcadores moleculares permiten obtener una gran cantidad de información sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas en una población o en poblaciones determinadas. Por tanto es posible establecer el estado de la diversidad genética de un recurso, animal, vegetal o de microorganismos estudiando su ADN. Con esto, un posible diseño ecotecnológico podría encontrar mayor o menor variabilidad genética en poblaciones de un ecosistema, y por tanto tomar decisiones, para que determinado germoplasma sea cruzado dentro del mismo ecosistema a fin que la variabilidad de dicha población aumente, para beneficio de la respuesta de los organismos al medio ambiente.

6. CONCLUSION

A pesar de sus ventajas probadas, y de la superioridad obvia de la biotecnología para varios usos respecto de otras tecnologías ecológicas, existe controversia sobre el empleo de las biotecnologías ambientales aplicadas a las ecotecnologías. Está claro que las transgénesis animales, vegetales y de microorganismos sí causarían un impacto importante a un ecosistema, por el riesgo de escape de los genes hacia los individuos silvestres. Queda sólo echar mano de las biotecnologías celulares en las cuales no se transforma el genoma, y se pueden seleccionar germoplasmas de los mismos ecosistemas objeto del diseño ecotecnológico. Las biotecnologías celulares implican dos grandes vertientes, las que tienen que ver con la restauración ecológica empleando microorganismos (bioprocesos y bitratamientos) y las que se refieren a la clonación de vegetales mediante la

micropropagación. Esta última conlleva el inconveniente de la baja de variabilidad genética que se introduciría al ecosistema receptor. De ahí la importancia de una tercer tipo de biotecnología que estaría en la caja de herramientas de las ecotecnologías, es decir los marcadores moleculares que permiten la medición de la diversidad biológica de poblaciones y la selección de individuos idóneos para las restauraciones ecológicas.

7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). 1998. Una empresa con futuro. El desarrollo económico y las Tecnologías Ecológicas. Londres. 272 pp.
- (2) Jorgensen, S. and Mitsch, W. 1998. Classification and examples of ecological engineering. En: Jorgensen, S. y Mitsch, W. Ecological engineering: An Introduction to ecotechology. John Wiley & Sons Inc. pp. 13-19.
- (3) Straskraba, M. 1998. Ecotechnology: Definition, Theory and Use in Water Management. Biomathematical Laboratory. Institute of Entomology. Academy of Sciences of the Czech Republic. En: www.czp.cuni.cz/stuz/Dokumenty/Emauzy/straskraba.html
- (4) Gutiérrez, L. G. 2004. Maestría en Ecotecnología, Una Propuesta de la Universidad Tecnológica de Pereira. En: VII Seminario Internacional del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Bucaramanga. v.1. p. 67-70
- (5) Gasser, C.; Fraley, R. 1992. Cultivos transgénicos. Investigación y Ciencia. Agosto.
- (6) Wilmut, I. 1999. Clonación con fines médicos. Investigación y Ciencia. Febrero.
- (7) Nieto, M.; Guevara, A.; Herrera, L. 2001. Inocuidad de los alimentos transgénicos. Investigación y Ciencia. Enero.
- (8) Miller, R. 1998. Intercambio de genes bacterianos en la naturaleza. Investigación y Ciencia. Marzo.
- (9) Plou F, Alcalde M, Ballesteros A. 1999. Estabilidad de los biocatalizadores. Investigación y Ciencia. Junio. pp. 46-55
- (10) Madigan, M.T., Mairs, B.L. 1997. Extremófilos. Investigación y Ciencia. Junio.
- (11) Sedanez, M. 1998. Ecología Industrial: Ingeniería medioambiental aplicada a la industria y a la empresa. 2da. Ed. Mundi-Prensa.

(12) Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), 2005. Por qué tienen importancia los recursos fitogenéticos.

En: http://www.ipgri.cgiar.org/institute/matter_es.htm

(13) Jiménez, E.A. 1998. Cultivo de Apices y Meristemos. En: Pérez Ponce, J.N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. 400 p.

(14) Pierik, L.M. 1995. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3° Ed. Mundiprensa. Madrid. 326pp.

(15) Roca, W. & Mroginski A. L. 1999. Cultivos de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali.

(16) Lauzer D, Dallaire S, Vincent G. 2000. In vitro propagation of reed grass by somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 60: 229-234.

(17) Henry, R.J. 1997. Practical applications of Plant Molecular Biology. Chapman & Hall. London p. 3-27.

(18) Nuez, F., Carrillo, J., De Ron, A. 2000. Problemas básicos de la mejora vegetal. EN: Nuez y Carrillo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. p. 1- 22.

(19) Phillips-Mora, W., Rodríguez, H. y Fritz, P. J. 1995. Marcadores de ADN: teoría, protocolos y aplicaciones de trabajo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, C.A.T.I.E. Turrialba, Costa Rica. p. 33-38.

(20) Garcia-Mas, J., Graziano, E., Aranzana, M.J., Monforte, A., Oliver, M., Ballester, J., Viruel, M.A. y Arus, P. 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos EN: Nuez, F y Carrillo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. p. 91-151.