

Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata Tomo 71 (2), Año 1995: 203-211

Embriogénesis somática y regeneración de plantas cítricas por cultivo *in vitro* de nucelas*

Hebe Y Rey¹, Adriana M Scocchi¹, LA Mroginski¹, Gísela S Márquez¹, Alicia Diamante², HM Zubrzycki² y Graciela Terada^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. CC 209, 3400 Corrientes, Argentina.
² EEA INTA Bella Vista. CC 5, 3432 Bella Vista, Corrientes, Argentina.

Recibido: 16 de Enero de 1995. Aceptado: 27 de Junio de 1995.

RESUMEN

Se describe un nuevo procedimiento que permite la inducción de embriones somáticos y la regeneración de plantas de *Citrus sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* y *C. limon*, mediante el cultivo *in vitro* de nucelas. Se ensayaron varios medios de cultivo. Para la inducción de embriones, uno de los mejores medios fue el de Murashige y Tucker, adicionado con 5 % de sacarosa. Para la germinación de los embriones se utilizó el medio de Murashige y Skoog con un 3 % de sacarosa. Las plantas obtenidas fueron exitosamente transplantadas al suelo.

Palabras claves: *Citrus spp.*, embriogénesis somática, nucela, regeneración plantas.

Somatic embryogenesis and plant regeneration from *in vitro* culture of nucella of *Citrus spp*

SUMMARY

A new protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from nucella cultures of *Citrus sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* and *C. limon* is described. Various media were tested. Murashige and Tucker medium (with 5 % sucrose) was found to be one of the best for induction of embryos. Murashige and Skoog medium (with 3 % sucrose) was used for germination.

Plants were regenerated and successfully transferred to the soil.

Key words: *Citrus spp.*, nucella, plant regeneration, somatic embryogenesis.

* Trabajo realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE IBONE.
Este trabajo fue parcialmente subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por el Centro Argentino Brasileño de Biotecnología (CABBIO).

INTRODUCCION

A partir de las observaciones de Steward *et al* (1958) y de Reinert (1958), sobre la diferenciación de embriones en cultivos de células y tejidos de zanahoria, este fenómeno fue descrito en otras especies vegetales: Tisserat *et al* (1979), Ammirato (1983), Williams y Maheswaran (1986). Estos embriones son generalmente, llamados somáticos, porque se diferencian directamente a partir de células, sin producirse la fusión gamética (Ammirato, 1987).

En el género *Citrus*, numerosos trabajos informan sobre la ocurrencia de embriones somáticos originados *in vitro*, mediante el cultivo de diversos tipos de explantos (Barlass y Skene, 1986). El cultivo de nucelas ha sido ampliamente utilizado para este fin. Sin embargo, la eficiencia de la producción de embriones somáticos depende de varios factores, tales como genotipo, composición del medio de cultivo, condiciones de incubación y estado del explanto (Rey *et al*, 1994).

En este trabajo se informa sobre un nuevo y eficiente procedimiento para el cultivo de nucelas de cuatro especies del género *Citrus*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se cultivaron nucelas de frutos inmaduros, procedentes de la EEA INTA Bella Vista, Provincia de Corrientes. Se trabajó con el material que se detalla en la Tabla 1.

Procedimiento para el cultivo de las nucelas

Como fuente de nucelas se utilizaron semillas de frutos inmaduros (14 - 15 semanas de post- polinización) con un diámetro de 2,5

Tabla 1. Material vegetal utilizado en este trabajo

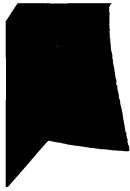
Plant material used in this work

Nombre vulgar	Especie	Variedad
Naranja	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck	Valencia late
"	"	Criolla mejorada
"	"	Bahianina
"	"	Hamlin
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i> Mac	Ruby
"	"	March seedless
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Murcott
"	"	Ellendale
Limón	<i>Citrus limon</i> L.Burm	Frost eureka

- 3,0 cm en las de *Citrus reticulata*, 3,5 - 4,0 cm de *C. sinensis* y de 4,0 - 4,5 cm de *C. paradisi* y *C. limón*.

Los frutos fueron desinfectados mediante su inmersión en etanol 70° (5 min) seguido de 1,6% de NaOCl (30 min) y, finalmente, enjuagados 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron extraídas y se realizó un corte longitudinal, dividiéndolas en dos mitades (Figura 1a). Se eliminaron el endosperma y los embriones existentes y se separó la nucela de los tegumentos, teniendo cuidado de no dañar el polo micropilar, donde se originarían luego los embriones somáticos (Figura 1 b y c). Mediante este procedimiento, de cada semilla se obtuvieron «dos medias nucelas», a diferencia de otros que recomiendan el cultivo de la nucela entera (Juárez *et al*, 1976; Tisserat, 1985).

Los explantos contenidos en frascos, con 30 ml de medio de cultivo obturados con Resinite AF 50[®], fueron incubados en un cuarto climatizado a 27 ± 2°C, con 14 h de fotoperiodo (10 W.m²), provenientes de focos fluorescentes Philips TLD 36W/84.



Medios de cultivo para la inducción de embriones somáticos

Los explantos fueron cultivados en el medio básico de Murashige y Tucker (1969) - en adelante MT - suplementado (salvo indicación en contrario) con sacarosa al 5%. En un experimento, el medio MT fue suplementado con ácido abscísico (ABA), a razón de 0,1; 0,5; 1 ó 1,5 mg.l⁻¹. En otro experimento se utilizaron 2 medios constituidos por MT + 500 mg.l⁻¹ de extracto de malta (EM) y por MT + 1 mg.l⁻¹ de ácido indolacético (AIA) + 0,1 mg.l⁻¹ de cinetina (CIN).

El pH de los medios fue ajustado antes del agregado del agar Sigma (A 1296) 0,8% a 5,8.

Los medios contenidos en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad (30 ml de medio por frasco) fueron esterilizados en un autoclave a 0,101 MPa durante 20 min.

Análisis de los resultados

La eficiencia en la producción de embriones somáticos fue determinada a los 30 días del cultivo de las nucelas, mediante el empleo del siguiente índice: $IE = Ne/Nc$. En, donde:

IE = índice embriogénico,

Ne = número de nucelas con embriones,

Nc = número de nucelas cultivadas,

En = número de embriones obtenidos por nucela.

En todos los casos se cultivaron 6 explantos por frasco y cada tratamiento consistió, de por lo menos, 4 de ellos. Todos los experimentos fueron repetidos durante 3 años consecutivos.

Germinación de embriones somáticos y obtención de plantas

Con el objeto de regenerar plantas, los embriones somáticos obtenidos de las nucelas, luego de 30 días de cultivo fueron

subcultivados en frascos similares al descrito, conteniendo 30 ml del medio de Murashige y Skoog (1962) - en adelante MS- conteniendo 2 mg.l⁻¹ de ácido giberélico (AG₃). Este regulador de crecimiento fue esterilizado haciéndolo pasar a través de filtros con poros de 0,45 µm. La germinación de los embriones se llevó a cabo a 27 ± 2°C, con un fotoperíodo de 14 h (10 W.m⁻²) suministrado por focos fluorescentes Philips TLD 36W/84.

Luego de 30 días de cultivo las plantas obtenidas, fueron transferidas individualmente a tubos de ensayo de vidrio (25 cm x 2,5 cm) que contenían 25 ml de MS (3% de sacarosa) desprovisto de reguladores de crecimiento. Los cultivos fueron mantenidos en las condiciones de incubación descritas anteriormente. Cuando las plantas alcanzaron una altura de 5 cm, se pasaron a una fase de adaptación, en la cual los tubos conteniendo las plantas, fueron irradiados con una densidad de flujo fotónico superior, (en un invernadero, bajo una malla que reducía la luz solar a un 80% y con una temperatura de 27 ± 3°C) durante 3 días.

Posteriormente, se perforó el resinito de los tubos y, en estas condiciones, las plantas permanecieron durante 2 días.

Una vez transcurrida la fase de adaptación, se lavaron las raíces de las plantas, antes de ser colocadas en macetas en un sustrato, constituido por tierra, turba y perlita en proporción 1:1:1 (v:v) (previamente humedecido y esterilizado en un autoclave a 0,101 MPa durante 60 min y luego aireado). Las macetas fueron regadas con la solución de MS diluida a la mitad, sin sacarosa y mantenidas en una cámara climatizada con 80 -90% de humedad relativa.

Luego de transcurridos 8 a 10 días, paulatinamente se comenzó a airear la cámara, conforme al grado de adaptación que se percibió, para después de 25 - 30 días,

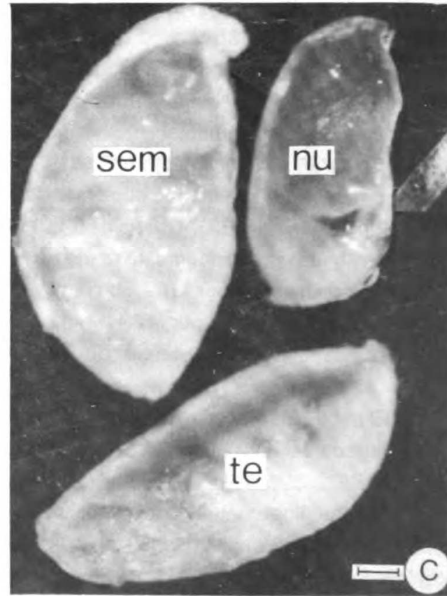
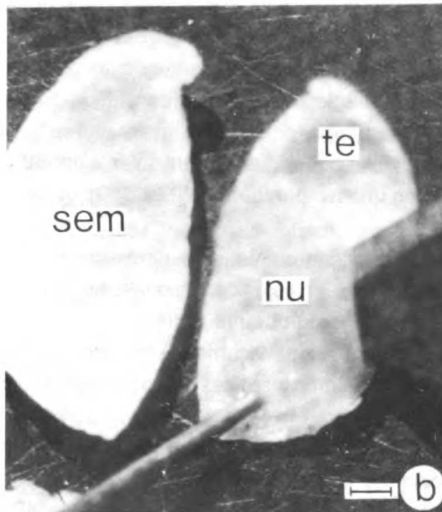
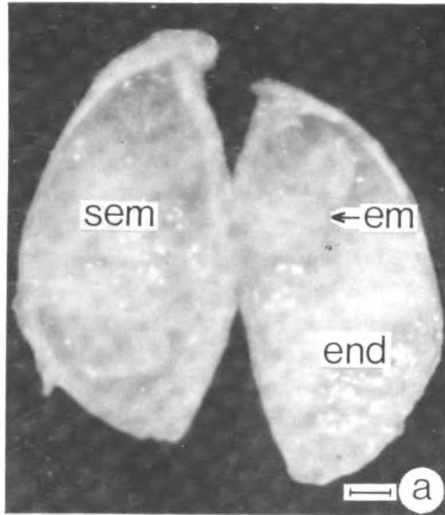


Figura 1. a - c. Extracción de las nucelas de *Citrus spp.* La barra representa 1 mm. **sem** = mitad de una semilla; **em** = embrión; **end** = endosperma; **te** = tegumento; **nu** = nucela. **a)** semilla bisectada longitudinalmente. **b)** separación de la nucela. **c)** nucela aislada de una mitad de la semilla.

a - c. Extraction of the nucellus from *Citrus spp.* Bar represents 1 mm. **sem** = one half of seed; **em** = embryo; **end** = endosperm; **te** = tegument; **nu** = nucellus. **a)** seed longitudinally bisected. **b)** separation of the nucellus. **c)** nucellus isolated from a half of seed.

eliminar definitivamente la cámara húmeda.

Las plantas obtenidas permanecieron en un invernadero hasta ser plantadas en el campo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inducción de embriones somáticos

En un experimento se cultivaron nucelas de todas las variedades cítricas detalladas en la Tabla 1. Los resultados obtenidos a los 30 días de cultivo (Tabla 2) permiten informar que, en todos los casos, se pudo inducir la formación de embriones somáticos (Figura 2 a, b, c).

Los valores de IE (índice embriogénico) hallados, dependieron de la variedad y del medio de cultivo. El IE más alto (7) se consiguió con la naranja Hamlin, una variedad poliembriónica, mientras que con el limón Frost eureka, una variedad monoembriónica,

Tabla 2. Efecto de 3 azúcares sobre el IE (índice embriogénico) de callos originados a partir de nucelas de especies cítricas.

Effect of three sugars on the IE (embryogenetic index) of calli originated by nucella culture of *Citrus* spp.

Especie	Variedad	IE (Índice Embriogénico)		
		MT + Sacarosa 5%	MT + Lactosa 5%	MT+ Galactosa 5%
<i>Citrus sinensis</i>	Valencia late	5,3	5,0	5,1
" "	Criolla mejorada	4,5	2,0	2,0
" "	Bahianina	—	—	1,0
" "	Hamlin	7,0	3,8	4,0
<i>C. paradisi</i>	Ruby	3,9	1,0	3,5
" "	March seedless	3,0	1,2	2,2
<i>C. reticulata</i>	Murcott	4,7	3,4	2,3
" "	Ellendale	0,2	—	—
<i>C. limon</i>	Frost eureka	1,0	0,1	—

se obtuvo un IE de sólo 0,1. Por otra parte, independientemente de la variedad, en general, los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó sacarosa como fuente carbonada del medio de cultivo.

En el caso de la naranja Valencia late, los tres azúcares ensayados brindaron resultados similares, lo que motivó que en los otros experimentos, donde se cultivaron únicamente nucelas de la naranja Valencia late y del pomelo Ruby, se empleara sacarosa al 5%. Estos resultados son similares a los hallados por otros autores, en el sentido que la respuesta a distintos azúcares depende de la especie utilizada (Kochba *et al*, 1982). Sin embargo, estos resultados no muestran la efectividad de la galactosa o de la lactosa en la formación de la embriogénesis, tal como lo informan Kochba *et al* (1978a; 1982), Hidaka y Omura (1989) y Kobayashi *et al* (1984). Es probable, que el empleo de especies y variedades diferentes a las ensayadas en este trabajo, expliquen la falta de coincidencia en los resultados obtenidos.

La adición de extracto de malta o de AIA

y CIN al medio MT, cuando se cultivaron nucelas de la naranja Valencia late, no se tradujo en diferencias en el IE, pero con el pomelo Ruby se logró un incremento del IE del orden del 60% cuando las nucelas fueron cultivadas en MT + AIA 1 mg.l⁻¹ + CIN 0,1 mg.l⁻¹ (Tabla 3).

Estos datos no concuerdan con lo informado por Kochba *et al* (1972) en el sentido que el extracto de malta - utilizado en más de la mitad de los trabajos publicados sobre el tema (Rey *et al*, 1994) - es un factor estimulante de la embriogénesis somática.

Los resultados hallados en este trabajo con el pomelo Ruby tampoco concuerdan con lo informado por otros autores en el sentido que las auxinas y las citocininas inhiben o reducen la embriogénesis somática (Kochba *et al*, 1982; Kochba y Spiegel-Roy, 1977; Wu y Zhang, 1991; Tisserat y Murashige 1977a; 1977b). Aunque, Huang *et al* (1990) al trabajar con 9 especies de *Citrus* encontraron que una citocinina (6 bencilaminopurina) estimuló la embriogénesis, mientras que el ácido naltalenacético la inhibió.

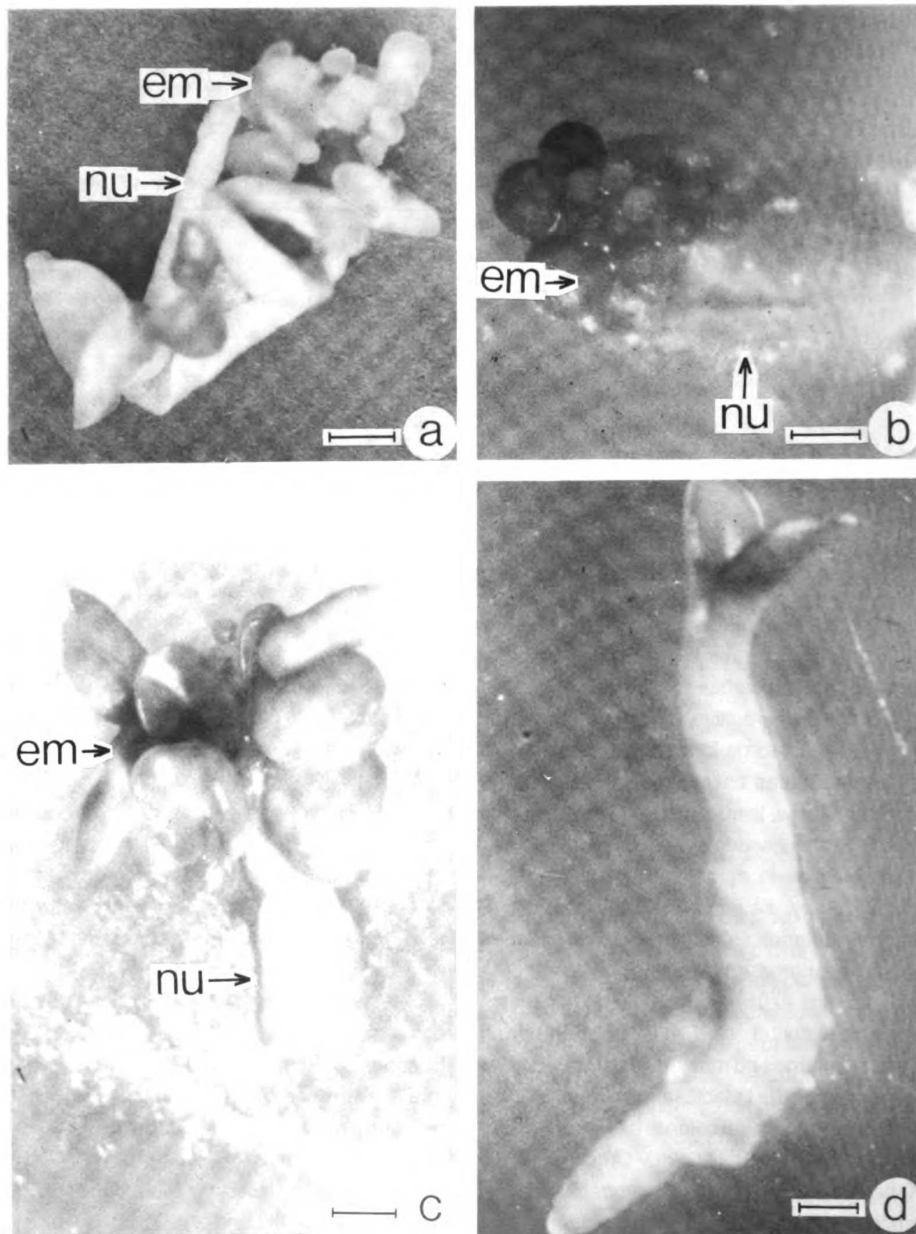


Figura 2. a - c. Formación de embriones somáticos (em) mediante el cultivo de nucelas (nu) de *Citrus spp.* d) germinación de un embrión somático de *Citrus sinensis* var. Valencia late. La barra representa 1 mm.

a - c Production of somatic embryos (em) by culture of nucellus (nu) of *Citrus spp.* d) germination of one somatic embryos of *Citrus sinensis* var. Valencia late. Bar represents 1 mm.

Tabla 3. Efecto de tres medios de cultivo en la inducción de embriones somáticos de naranja Valencia late y pomelo Ruby

Effect of three culture media on the somatic embryogenesis of orange Valencia late and grapefruit Ruby

Material Vegetal	Variedad	IE (Indice Embriogénico)		
		MT	MT + EM (500 mg.l ⁻¹)	MT + AIA (1 mg.l ⁻¹) + CIN (0,1 mg.l ⁻¹)
<i>Citrus sinensis</i>	Valencia late	4,3	4,0	4,5
<i>C. paradisi</i>	Ruby	4,2	4,5	7

El agregado de ABA al medio MT produjo una ligera estimulación en la embriogénesis somática, reflejada en los valores obtenidos de IE. Esto ha sido notable en el pomelo Ruby, donde la adición al medio MT de ABA (1,0 mg.l⁻¹) posibilitó un incremento del 50 % del IE (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kochba *et al* (1978b).

Germinación de los embriones somáticos

Los embriones somáticos obtenidos mediante el cultivo de nucelas, de todas las variedades cítricas detalladas en la Tabla 1,

Tabla 4. Efecto del agregado de ABA en la embriogénesis somática de nucelas de naranja y pomelo cultivados en el medio MT.

Effect of ABA addition on the somatic embryogenesis in nucella cultures of orange and grapefruit cultured on MT medium.

ABA mg.l ⁻¹	IE (Indice Embriogénico)	
	naranja Valencia late	pomelo Ruby
0	4,2	4,0
0,1	4,2	4,1
0,5	4,9	5,0
1,0	5,0	6,1
1,5	5,0	5,1

germinaron cuando fueron cultivados en MT + 2 mg.l⁻¹ de AG₃ (Figura 2 d) y las plantas resultantes fueron exitosamente transferidas al suelo (Figura 3 a, b). Con la naranja Valencia late y el pomelo Ruby se pudo apreciar, que los mayores porcentajes de conversión de embriones a plantas, se conseguían cuando los medios iniciales (medios de inducción de embriones) contenían 1,5 mg.l⁻¹ de ABA (Tabla 5).

Finalmente, es interesante destacar que en este trabajo se logró un nuevo y eficiente procedimiento para el cultivo de las nucelas de especies cítricas, dado que de cada semilla

Tabla 5. Efecto de la composición del medio de inducción de embriones sobre la obtención de plantas, en el medio MS + AG₃ (2 mg.l⁻¹), de naranja Valencia late y de pomelo Ruby.

Effect of the induction medium on the production of plants of orange and grapefruit on the medium MT + AG₃ (2 mg.l⁻¹).

ABA (mg.l ⁻¹) adicionado a MT	% de embriones que forman plantas	
	naranja Valencia late	pomelo Ruby
0	22	20
0,1	20	28
0,5	15	30
1,0	15	27
1,5	51	35



Figura 3: Plantas de *Citrus sinensis* var. Valencia late obtenidas a partir del cultivo de nucelas transferidas a macetas (a) y posteriormente al campo (b).

Plants of *Citrus sinensis* var. Valencia late obtained by culture of nucellus. a) Plants growing in pots. b) Plants growing in field.

se emplearon «dos medias nucelas», en cambio, con otros procedimientos se lo hace con «la nucela entera» (Juárez et al, 1976; Tisserat, 1985).

El nuevo procedimiento sugerido, brinda las siguientes ventajas:

a) Se extraen entre 25 - 30 nucelas por hora (es decir, 50 - 60 explantos o medias nucelas) en cambio, con el procedimiento de Tisserat se extraen 12 - 14 nucelas en el mismo lapso.

b) Ambas mitades forman embriones con la misma eficiencia, con la ventaja de que, con las nucelas partidas, no existen impedimentos mecánicos para el crecimiento de los embriones somáticos.

c) En el caso de utilizar cultivos nucelares para someterlos a rayos mutagénicos, el uso del cultivo de «medias nucelas» facilita uniformar las dosis recibidas en la superficie de los explantos.

BIBLIOGRAFIA

- Ammirato PV** (1983) Embryogenesis. En: Handbook of Plant Cell Culture. DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato and Y Yamada, Eds. Macmillan Publishing Co, New York: 82 - 123.
- Ammirato PV** (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. En: Plant Tissue & Cell Culture. CE Green, DA Somers, WP Hackett y DD Biesboer, Eds. Alan R Liss Inc, New York: 57 - 81.
- Barlass M and KGM Skene** (1986) *Citrus*. En: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 1 Trees I. YPS Bajaj, Ed. Springer Verlag, Berlin: 207 - 219.
- Hidaka T and M Omura** (1989) Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture: Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. Bulletin of the Fruit Tree Research Station B 16: 1 - 17.
- Huang LC, WL Chen, KY Yeang and BL Huang** (1990) Hormonal requirements for proliferation of

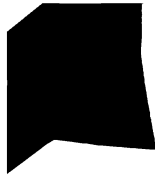
pseudobulbils in *Citrus* nucellus cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica 31: 211 - 216.

Juárez J, L Navarro et JL Guardiola (1976) Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle in vitro. Fruits 31: 751 - 762.

Kobayashi S, I Ikeda and M Nakatani (1984) Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osb) ovules, and uniformity of regenerated plants. Bulletin of the Fruit Tree Research Station E, 5: 43 - 54.

Kochba J, S Spiegel-Roy and H Safran (1972) Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. Planta 106: 237 - 245.

Kochba J and P Spiegel-Roy (1977) The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the «Shamouti» orange (*Citrus sinensis*). Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 81



Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata Tomo 71 (2), Año 1995: 203-211

- :283 - 288.
- Kochba J, P Spiegel-Roy, S Saad and H Neumann** (1978a) Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. *Naturwissenschaften* 65: 261.
- Kochba J, P Spiegel-Roy, H Neumann and S Saad** (1978b) Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA₃. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 89: 427 - 432.
- Kochba J, P Spiegel-Roy, H Neumann and S Saad** (1982) Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 105: 359 - 368.
- Murashige T and F Skoog** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 - 497.
- Murashige T and DPH Tucker** (1969) Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. *Proceedings First International Citrus Symposium* 3: 1155 - 1161.
- Reinert J** (1958) Morphogenese und ihre Kontrolle an gewebekulturen aus carotten. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 71 : 15.
- Rey HY, LA Mroginski and AM Scocchi** (1994) Embriogénesis somática por cultivo de nucelas. En: *Cultivo de tejidos en especies cítricas*. T Netto, Ed. San Paulo (En prensa).
- Steward FC, MO Mapes and K Mears** (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in culture grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45: 705 - 708.
- Tisserat B and T Murashige** (1977a) Probable identity of substances in *Citrus* that repress asexual embryogenesis. *In Vitro* 13: 785 - 789.
- Tisserat B and T Murashige** (1977b) Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators. *In Vitro* 13: 799-805.
- Tisserat B, EB Essan and T Murashige** (1979) Somatic embryogenesis in Angiosperms. *Horticultural Review* 1 : 1 - 78.
- Tisserat B** (1985) Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. En: *Plant Cell Culture*. RA Dixon, Ed. IRL Press, Oxford : 79 - 105.
- Williams EG and G Maheswaran** (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443 - 462.
- Wu J and W Zhang** (1991) Studies on the ovule culture and somatic embryogenesis of *Citrus*. En *Proceedings of the International Citrus Symposium* B Huang and Q Yang, Eds. China : 176 - 181.