

COADYUVANTES EN EL DESARROLLO *in vitro* DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS EN CALLOS DE *Citrus*

J. L. Rodríguez-De La O¹; R. Villalobos-Pietrini²

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. México. Correo-e: jrguez@taurus1.chapingo.mx (Autor responsable).

²Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Ciencias de la Atmósfera. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM 04510. D.F., México Correo-e: rvp@atmosfera.unam.mx.

RESUMEN

Coadyuvantes de la embriogénesis somática en *Citrus* como el extracto de malta y el glicerol promovieron la formación de estructuras embriogénicas a partir de callos de *C. sinensis* cv. Jaffa en un 50 % después de seis semanas de cultivo, los callos fueron obtenidos después de ocho semanas en un Murashige y Skoog (MS) con 1.0 mg·litro⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y en combinación con 0.1 mg·litro⁻¹ de kinetina. La incorporación de los coadyuvantes y disminuir tanto las fuentes de amonio y nitratos en el medio, también fueron ensayadas en el cultivo *in vitro* de callos de diferentes cultivares de *Citrus*, combinando tratamientos de L-prolina y L-glutamina, los callos subcultivados de *Citrus* del cv. Valencia Tardía mostraron las mejores respuestas embriogénicas en los tratamientos con 150 mg·litro⁻¹ de L-prolina, con la fuente de amonio disminuida al 75 %, y las sales Murashige y Skoog MS diluidas al 50 %. Los tratamientos con las sales MS y amonio en los diferentes tratamientos con L-glutamina promovieron la formación de estructuras globulares o embriogénicas en callos de *C. sinensis* L. Osbeck cv. Parson Brown, *C. sinensis* L. Osbeck cv. Jaffa, y *C. sinensis* L. Osbeck cv. Valencia Tardía. En el cultivo de células en suspensión los callos tomados del cultivar *C. sinensis* x *C. reticulata* cv. Mónica, desarrollaron después de ocho semanas, estructuras embriogénicas y posteriormente embriones verdes en medios líquidos donde se adicionó 46 g·litro⁻¹ de galactosa y 38 ml·litro⁻¹ de glicerol más 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta. Las respuestas en el cultivo de células, fueron nulas en los medios donde se empleó ácido abscísico y L-prolina.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: somático, poliembrionía, regeneración, proembriones, tejido nuclear, cultivo de tejidos

COADJUTANTS IN THE *in vitro* DEVELOPMENT OF *Citrus* CALLUSES

SUMMARY

Coadjutants of somatic embryogenesis, such as malt extract and glycerol, induced formation of 50 % of the embryogenic structures in calluses of *Citrus sinensis* cv. Jaffa after 6 weeks of *in vitro* culture. The calluses of different cultivars were obtained from nucellar tissue in a Murashige and Skoog (1962) culture medium (MS), with 1.0 mg·liter⁻¹ dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1 mg·liter⁻¹ kinetin. Adding coadjutants and reducing sources of both ammonium and nitrates in the medium were also tested in *in vitro* culture of calluses of different cultivars of *Citrus*. Combining treatments of L-proline and L-glutamine, the subcultured calluses of *Citrus* cv. Valencia Late had the best embryogenic response to the treatments with 150 mg·liter⁻¹ L-proline, with the source of ammonium reduced to 75 %, and the Murashige and Skoog salts diluted to 50 %. The treatments with MS salts and ammonium in the different treatments with L-glutamine promoted the formation of globular, or embryogenic, structures in the calluses of *C. sinensis* L. Osbeck cv. Parson Brown *C. sinensis* L. Osbeck cv. Jaffa, and, *C. sinensis* L. Osbeck cv. Valencia Late. In cell suspension culture, the calluses taken from the cultivar *C. sinensis* x *C. reticulata* cv. Monica, developed embryogenic structures after eight weeks, and later, green embryos in liquid mediums to which 46 g·liter⁻¹ of galactose and 38 ml·liter⁻¹ of glycerol plus 500 mg·liter⁻¹ of malt extract were added. There was no response in cell cultures with mediums in which abscisic acid and L-proline were used.

ADDITIONAL KEY WORDS: somatic, polyembryonic, regeneration, nucellar proembryos, tissue culture.

INTRODUCCIÓN

El éxito de los mecanismos de la transformación genética pueden basarse sobre la regeneración de plantas completas a través de la obtención en forma múltiple de

embriones somáticos a partir de los callos transformados. En diferentes géneros de *Citrus* los callos con capacidad embriogénica, pueden obtenerse mediante el cultivo *in vitro* de diversos tejidos extraídos de la nucela, endospermo,

epicótilo, segmentos de raíz y óvulos inmaduros (Hidaka y Kajiuira, 1988; Sim *et al.*, 1988; Hidaka y Omura, 1989). Por otra parte, desde el punto de vista del mejoramiento genético, las plantas resultantes de la embriogénesis somática obtenida a partir del tejido endospermático, pueden salvar barreras sexuales de hibridación, con la posibilidad de obtener nuevos híbridos (Gmitter *et al.*, 1990). En callos los embriones somáticos pueden derivarse de manera indirecta a partir de células embriogénicas, promoviendo divisiones mitóticas repetidas de células individuales, generalmente localizadas sobre la superficie de los callos o de las células periféricas de masas celulares (Moore *et al.*, 1982). En el cultivo de células en suspensión, la obtención de plantas completas a través de este mecanismo, puede representar una excelente alternativa para coadyuvar de manera eficiente con las técnicas de transformación genética de células utilizadas como receptoras. Algunos factores que limitan esta respuesta *in vitro*, es la imposibilidad de algunos genotipos de *Citrus* para formar callos embriogénicos, así como la necesidad de contar con algunos promotores o coadyuvantes de la embriogénesis como la galactosa, y el extracto de malta glicerol (Starrantino y Caponetto, 1990). Por otra parte, la capacidad embriogénica de los callos de origen nucelar, se limita muchas veces al tipo de cultivar, edad de las semillas obtenidas después de la floración (Pasqual *et al.*, 1988), presencia en el medio de 2,4-D, ácido abscísico (ABA) (Walker y Sato, 1981). Aún en callos con una excelente capacidad embriogénica, existen otras limitantes que contrarrestan la posibilidad de explotación, debido a que en *Citrus* las células *in vitro* pueden estar expuestas por diferentes periodos de tiempo, a elevados niveles de sales y en particular al amonio (NH_4) y nitratos (NO_3) pudiendo resultar tóxicos, por lo que algunas estrategias empleadas frecuentemente se dirigen a disminuir su presencia o substituir al N inorgánico, por otras formas reducidas de N, como amidas y o la incorporación de aminoácidos, como la asparagina, glutamina, alanina, L-prolina y, combinaciones de lisina y treonina (Grosser y Gmitter 1990). En gramíneas la embriogénesis somática, se ha destacado gracias a la incorporación de la L-prolina, mejorando con la regulación osmótica las respuestas sobre el crecimiento de embriones, habilitándolos posteriormente para formar plantas completas (Conger *et al.*, 1983; Armstrong y Green, 1985).

MATERIALES Y MÉTODOS

Callos embriogénicos

Se utilizaron semillas de cinco genotipos de *Citrus* de una edad de entre 8 y 11 semanas después de la floración de *Citrus sinensis* cv. Parson Brown, *C. sinensis* cv. Jaffa, *Citrus reshni* Tan. cv. Cleopatra, *C. sinensis* cv. Valencia Tardía y *C. limonia* cv. Rangpure provenientes del campo experimental del INIFAP de General Teherán Nuevo León,

México. Las semillas exponiendo el tejido nucelar fueron sembradas *in vitro* y derivaron callos en un medio básico Murashige y Skoog (1962), suplementado con 3 % de sacarosa, 0.4 mg·litro⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg·litro⁻¹ myo-inositol y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta, utilizando dos tratamientos con 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D. y combinando 0.1 mg·litro⁻¹ de kinetina, más 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D. La incubación fue bajo una intensidad luminosa de 56.09 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con lámparas de luz fluorescente SLIMLINE de 75 w, con 26 °C, 16 horas luz y 24 °C, con 8 horas de oscuridad.

Diferenciación y cuantificación de estructuras globulares o proembriones

A partir del subcultivo de callos se buscó inducir la formación de embriones somáticos en forma indirecta, se utilizó tejido nucelar de semillas de los cultivares sembrados en los medios de cultivo con 2,4-D y kinetina, y posteriormente fueron transferidos a un medio con las sales MS con vitaminas, 3 % de sacarosa, 10 ml·litro⁻¹ de glicerol, y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta. La diferenciación de estructuras globulares, o proembriones a partir de los callos, se cuantificó utilizando un microscopio estereoscópico WILD TYP 308700 Heerbrugg, Switzerland con una lente Plan 1x y 10x /21. calculando los porcentajes en los resultados obtenidos de acuerdo a la formación y número de estructuras después de 8 semanas de cultivo. Para promover la diferenciación de las respuestas embriogénicas o proembrionarias a partir de callos subcultivados de los cinco genotipos de *Citrus*, se exploraron los siguientes cuatro medios de cultivo:

1. Medio de cultivo con 100 % de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), disminuyendo únicamente el 75 % la fuente de amonio (NH_4), utilizando como tratamientos de L-prolina 0, 150, 250, 350 mg·litro⁻¹.
2. Medio con las sales de MS diluidas al 50 % con los tratamientos de L-prolina 0, 150, 250, 350 mg·litro⁻¹.
3. Medio con las sales de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, disminuyendo el 75 % la fuente de amonio y empleando como tratamientos de glutamina 0, 200, 400, 600 mg·litro⁻¹.
4. Medio con las sales de Murashige y Skoog (1962) diluidas al 50 % con los tratamientos de glutamina 0, 200, 400, 600 mg·litro⁻¹.

Los suplementos utilizados adicionalmente en los cuatro medios de cultivo, fueron 5 % de sacarosa, 10 mg·litro⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg·litro⁻¹ de myo-inositol, 5.0 mg·litro⁻¹ de ácido nicotínico, 10 mg·litro⁻¹ de piridoxina, 10 mg·litro⁻¹ de glicina, 500 mg·litro⁻¹ de extracto de alta y 10 ml·litro⁻¹ de

glicerol, ajustándolo a un pH de 5.6 ± 0.1 con NaOH y HCl-1 N. gelificándolo con Difco Bacto Agar al 0.8 %. En todos los experimentos se tomaron 20 repeticiones para cada tratamiento, y como variables en los callos subcultivados con un peso fresco aproximado de 600 mg, se evaluaron el número de embriones formados, su crecimiento expresando los incrementos de peso en miligramos, y en los niveles de necrosamiento (oxidación), asignando para su análisis estadístico, el valor de 1 en respuestas mínimas y 2 para las respuestas elevadas o muy necrosadas, se empleó un programa MSTAT-P (Michigan State University Statistical Package) bajo un diseño experimental completamente al azar.

Cultivo de células en suspensión

Para inducir la formación de embriones a partir del cultivo de células en forma líquida, se tomaron callos de tejido nuclear, con un peso fresco aproximado de 600 mg de *Citrus sinensis* x *C. reticulata* cv. Mónica, los cuales fueron colocados para su disgregación en tres medios de cultivo líquidos elaborados con diferentes constituyentes y distribuidos en frascos de tipo Gerber, los cuales se colocaron en un agitador marca LAB-LINE Shaker Melrose Park ILL. No 03590 Orbit, a una velocidad de 80 rpm.

Medio S₁: Conteniendo las sales del medio de Nitsch (1969), sin reguladores, y suplementado con 100 mg·litro⁻¹ de mio-inositol, 5.0 mg·litro⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg·litro⁻¹ piridoxina-HCL, 0.5 mg·litro⁻¹ de tiamina-HCL, 2.0 mg·litro⁻¹ de glicina, 0.5 mg·litro⁻¹ de ácido fólico, 0.5 % de biotina, probando el efecto de 12 μM de prolina, 50 mM de ácido abscísico, 6 % de sacarosa y 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D.

Medio S₂: constituido con las sales de Murashige y Skoog (1962), con la adición de 46 g·litro⁻¹ de galactosa, 30 μM de ácido giberélico y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta.

Medio S₃: Utilizando las sales de MS al 100 %, agregando 30 mg·litro⁻¹ de glicerol, 30 μM de ácido giberélico (AG₃) y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta.

La incubación para el cultivo de células en suspensión y cultivares empleados, se realizó con 16 h bajo una intensidad lumínica de 16.69 μmol·m⁻²·s⁻¹ y 8 h de oscuridad, con una temperatura constante de incubación de 24 °C utilizando cinco repeticiones por medio de cultivo y en cada cultivar, cuantificando mediante porcentajes los niveles encontrados de contaminación, necrosamiento (oxidación), el número y color de estructuras globulares o proembriones, así como el número de embriones formados completamente.

Histología

A partir de los callos con respuestas embriogénicas en los diferentes cultivares de *Citrus* y posteriormente

subcultivados en los medios de cultivo ensayados, fueron tomadas muestras en fresco de cada uno de los tubos de ensayo y se les realizó una tinción combinada con safranina al 1 % durante 30 minutos y verde rápido 2 minutos, en solución alcohólica al 50 % para posteriormente realizar las observaciones en cuanto división y actividad meristemática de las células previa a la formación de estructuras de tipo embrionario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los callos de *Citrus*, de los cinco genotipos evaluados, con combinaciones de 2,4-D y kinetina, y subcultivados posteriormente en un medio MS con glicerol, y extracto de malta, mantuvieron respuestas homogéneas para diferenciar estructuras embriogénicas o proembriones. Destacaron los callos de *C. sinensis* cv. Jaffa provenientes del medio con 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D. Otras respuestas fueron observadas para *C. sinensis* 'Valencia Tardía', *C. limonia* mandarina 'Rangpure'. La mandarina 'Cleopatra' *C. reshni*, fue la que presentó escasos porcentajes de respuestas hacia la formación de estructuras embriogénicas. Fue claro observar que las respuestas embriogénicas a partir del cultivo de callos, incorporando a los medios glicerol y extracto de malta fueron limitadas en la mayoría de los genotipos empleados, lo anterior coincide con Vardi *et al* (1982) y Chaleff y Parson (1978), quienes reportaron, que el efecto del glicerol para promover la embriogénesis se restringe a pocos cultivares de *Citrus* donde se promueve la formación de callos, y que su subcultivo pueden promover fuertes niveles de necrosamiento, aunado a los periodos largos en los que se pueden involucrar los tejidos o células a la acción de auxinas como el 2,4-D, cuyos efectos pueden a la larga limitar las repuestas embriogénicas.

Influencia de la L-prolina y glutamina en la formación de proembriones a partir de callos

Sólo el nivel de 150 mg·litro⁻¹ de L-prolina, conjuntamente con la participación de coadyuvantes como el extracto de malta y disminuyendo 75 % el amonio (NH₄), y manteniendo el resto de las sales de MS al 100 %, después de ocho semanas de cultivo estimularon escasamente la formación de proembriones en el cultivo *in vitro* de callos de los cultivares de *Citrus* utilizados, de acuerdo con en análisis estadístico, evaluando por otra parte tanto el crecimiento de callos, niveles de oxidación, únicamente el cv. Valencia Tardía, que mostró diferencias significativas, en cuanto al crecimiento de callos y formación de proembriones, aunque también se pudo observar fuertes niveles de necrosamiento en los callos (Cuadro 1).

CUADRO 1. Efecto de las sales de Murashige y Skoog (1962) MS al 100 %, agregando 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta y 150 mg·litro⁻¹ de L-prolina en callos subcultivados de cuatro cultivares de *Citrus*; evaluando su crecimiento, número de embriones, y niveles de necrosamiento (oxidación). Después de ocho semanas.

Cultivares	Crecimiento de Callos (mg)	Número de Embriones	Niveles Necrosamiento (1, 2) ^y
'Parson Brown' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.344 b ^z	1.188 bc	1.594 b
'Jaffa' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.344 b	1.406 b	1.844 a
'Valencia Tardía' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.875 a	2.000 a	1.906 a
'Rangpure' (<i>Citrus limonia</i>)	1.219 b	0.969 c	1.813 ab

^z valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

^y valores de 1 bajos y 2 altos niveles de necrosamiento

Por otra parte en el experimento, en donde se mantuvieron los mismos niveles de L-prolina, la adición del extracto de malta y disminuyendo al 50 % las sales de MS, los resultados mostraron que 'Valencia Tardía' de igual forma que en experimento anterior destacara, mostrando diferencias significativas desarrollando mejores respuestas tanto para la formación de callos y diferenciación de estructuras proembrionarias o de tipo globular, no obstante los callos subcultivados, presentaron niveles de oxidación menores comparado al que presentaron los otros genotipos de *Citrus* evaluados (Cuadro 1). Así como algunos autores han destacado que para el cultivo de callos en *Citrus*, los niveles de amonio y nitratos pueden jugar un papel importante para promover las respuestas embriogénicas, aquí la estrategia de incorporar aminoácidos, conjuntamente con la disminución del amonio y la adición de coadyuvantes como el extracto de malta, no estimularon en forma eficiente la formación de estructuras proembrionarias en la mayoría de los cultivares de *Citrus* explorados. Aunque por otra parte existen reportes de autores como, Conger *et al.* (1983), y Armstrong y Green (1985), quienes han reportado substituir al N inorgánico con amidas u aminoácidos para estimular en los tejidos o en células la formación de embriones somáticos tanto en forma directa como indirecta. Otras investigaciones, señalan que las frecuencias embriogénicas en *Citrus*, dependen de los niveles y tiempo de cultivo de las células en presencia de 2,4-D, así como la relación NH_4NO_3 y KNO_3 , siendo más frecuente en un 70 a 77 % con niveles de 0.01 mg·litro⁻¹ de 2,4-D y más con la presencia de amonio y ausencia de nitratos (Song *et al.*, 1991).

CUADRO 2. Efecto del medio básico de Murashige y Skoog (1962) diluido al 50 %, más suplementos y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta y 150 mg·litro⁻¹ de L-prolina en callos de cuatro *Citrus*, evaluando su crecimiento, formación de estructuras globulares o proembriones y niveles de necrosamiento (oxidación). Después de ocho semanas.

Cultivares	Crecimiento de Callos (mg)	Número de Embriones	Niveles Necrosamiento (1, 2) ^y
'ParsonBrown' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.175 b ^z	1.050 bc	1.825 a
'Jaffa' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	0.800 c	0.850 c	1.775 a
'Valencia Tardía' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.650 a	1.750 a	1.600 b
'Rangpure' (<i>Citrus limonia</i>)	1.100 b	1.100 b	1.450 ab

^z valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

^y valores 1 bajos, 2 altos niveles de necrosamiento

Los tratamientos de glutamina en callos de los cuatro *Citrus*, en el medio donde se disminuyó al 75 % el amonio (NH_4), y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta, manteniendo el resto de las sales MS al 100 %, tampoco influyeron para promover la formación de proembriones en los callos subcultivados, únicamente el cv. Valencia Tardía, destacó con respuestas favorables tanto para la formación de proembriones y crecimiento de callos, los niveles de oxidación fueron estadísticamente menores a lo observado en los otros genotipos de *Citrus* estudiados (Cuadro 3).

CUADRO 3. Efecto de las sales de MS (1962) al 100 %, más suplementos más 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta y 200 mg·litro⁻¹ de glutamina, en callos de cuatro cultivares de *Citrus*, evaluando su crecimiento, formación de estructuras globulares o proembriones y niveles de necrosamiento. Después de ocho semanas.

Cultivares	Crecimiento de Callos (mg)	Número de Embriones	Niveles Necrosamiento (1, 2) ^y
'Parson Brown' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.750 a ^z	1.594 a	1.594 b
'Jaffa' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.656 a	1.344 ab	1.938 a
'Valencia Tardía' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.281 b	1.281 ab	1.875 a
'Rangpure' (<i>Citrus limonia</i>)	1.344 b	1.031 b	1.781 b

^z valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

^y valores 1 bajos y 2 altos de necrosamiento.

En el medio de cultivo donde se ensayaron los mismos niveles de glutamina, en callos de los cuatro *Citrus*, disminuyendo las sales inorgánicas de MS al 50 %, incluyendo la incorporación del amonio (NH_4) al 75 % y los 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta, mantuvieron las mejores respuestas para la formación de proembriones a partir de los callos cultivados después de las ocho semanas de cultivo (Cuadro 4).

CUADRO 4. Efecto de las sales de MS (1962) diluidas al 50 % con suplementos, agregando 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta, y 200 mg·litro⁻¹ de glutamina en callos de cuatro *Citrus* evaluando el número de estructuras globulares o proembriones y niveles de necrosamiento (oxidación). Después de ocho semanas.

Cultivares	Número de Embriones	Nivel de Necrosamiento (1, 2) ^y
'Parson Brown' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.292 bc ^z	1.969 a
'Jaffa' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.500 a	1.719 b
'Valencia Tardía' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	1.670 a	1.594 b
'Rangpure' (<i>Citrus limonia</i>)	1.083 c	

^z valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

^y valores de 1 bajos y 2 altos niveles de oxidación.

Los callos provenientes del medio con 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D y posteriormente subcultivados mantuvieron su crecimiento en forma constante en la mayoría de los cultivares de *Citrus* evaluados y la interacción observada entre cultivares y medios de cultivo mostró diferencias estadísticamente superiores para el cultivar de naranja 'Valencia Tardía' en callos provenientes del medio combinando 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D con 0.1 mg·litro⁻¹ de kinetina (Cuadro 5).

Otras evaluaciones estadísticas permitieron detectar que en las interacciones entre cultivares, medios de cultivo

y concentraciones de L-prolina, para promover la formación de estructuras embriogénicas partir de callos se logró cuando se emplearon los niveles de 0.0 y 150 mg·litro⁻¹ de L-prolina disminuyendo 75 % el amonio (NH_4), y el resto de las sales MS al 50 %, con 5 % de sacarosa, y adicionado 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta. De los cultivares de *Citrus* empleados únicamente los callos del cultivar Valencia Tardía (*C. sinensis*) fueron los que presentaron diferencias significativas, observando por otra parte, que los callos provenientes de medios combinando 1.0 mg·litro⁻¹ de 2,4-D y con 0.1 mg·litro⁻¹ de kinetina tampoco incrementaron las respuestas embriogénicas en callos que posteriormente fueron subcultivados en los diferentes niveles de L-prolina y únicamente, el nivel de 200 mg·litro⁻¹ de glutamina promovió notoriamente la formación de estructuras embriogénicas en los callos de *C. sinensis* cultivar Valencia Tardía.

Cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión de *C. sinensis* x *C. reticulata* cv. Mónica, desarrolló 60 % de respuestas embriogénicas, cuando se emplearon las sales de MS suplementadas, adicionalmente 30 μM de ácido giberélico (AG_3), 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta y substituyendo a la sacarosa por 46 g·litro⁻¹ de galactosa. Para este mismo cultivar se observaron respuestas del 50 % en el desarrollo de estructuras embriogénicas y embriones, empleando el sistema de cultivo células en suspensión combinando con las sales de MS 30 μM de ácido giberélico (AG_3), 30 mg·litro⁻¹ de glicerol, y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta. En las respuestas logradas bajo el cultivo de células en suspensión cabe destacar la adición del glicerol y la galactosa, coincidiendo lo anterior con diversos autores que han identificado a estos compuestos como excelentes promotores de las respuestas embriogénicas en *Citrus* (Gavisth *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1991; Vu *et al.*, 1993). Finalmente en estudios citológicos demostraron que las células que participan en derivar embriones, pueden ser diferenciarse porque presentan una densidad de citoplasma, largos núcleos, contenidos de plastídios y esferosomas, observando una continuidad citoplasmática con células vecinas a través de numerosos plasmodesmos o plasmodesmatas, que como conexiones desaparecen más tarde durante el desarrollo de los embriones (Street y Witters, 1974).

CUADRO 5. Interacción observada entre los medios y cultivares en respuesta hacia el crecimiento de callos en cuatro *Citrus*, utilizando las sales de MS (1962) al 100 %, más suplementos y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta.

Medios	Naranja 'Parson Brown'	Naranja 'Jaffa'	Naranja 'Valencia Tardía'	Mandarina 'Rangspure'
1.0 mg·litro ⁻¹ de 2,4-D	1.625 ab ^z	1.688 ab	1.688 ab	1.563 b
1.0 + 0.1 mg·litro ⁻¹ de kinetina	1.063 c	1.000 c	2.063 a	0.875 c

^z valores con la misma letra son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

CONCLUSIONES

La edad de las semillas no influyó en las respuestas embriogénicas observadas en los diferentes genotipos de *Citrus* tanto para la formación de callos y en las respuestas embriogénicas.

Los callos obtenidos del tejidos nucelar y en su subcultivo, se pudo observar que los tratamientos previos con 2,4-D y kinetina, influyeron de manera determinante inhibiendo las respuestas embriogénicas en la mayoría de los cultivares de *Citrus* experimentados.

Con la adición de los coadyuvantes empleados, el cultivar Valencia Tardía (*C. sinensis* L. Osbeck), mantuvo las mejores respuestas para el desarrollo de embriones *in vitro*.

La estrategia de incorporar en el medio de cultivo de los aminoácidos L-prolina y glutamina, modificado la presencia de amonio y niveles de sales, conjuntamente con la adición de otros coadyuvantes de la embriogénesis somática en *Citrus*, no promovieron la formación de embriones somáticos a partir de los callos.

Dentro del manejo de células en forma líquida o en suspensión utilizando las sales inorgánicas de MS (1962), las respuestas embriogénicas fueron sustancialmente promovidas con la adición conjunta de 46 g·litro⁻¹ de galactosa, 30 µM de ácido giberélico, y 500 mg·litro⁻¹ de extracto de malta. En la embriogénesis somática *in vitro* destacó la mandarina 'Mónica' (*C. sinensis* x *C. reticulata*) debido a su naturaleza poliembriónica.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro sincero agradecimiento al Dr. Mario Peña-Rocha, por haber facilitado los genotipos de *Citrus* del campo experimental de General Teherán, Nuevo León, México, y al apoyo técnico del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

LITERATURA CITADA

- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. 1985. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214
- CHALEFF, R.S.; PARSON, M.F. 1978. Isolation of glycerol utilizing mutant of *Nicotiana tabacum*. *Genetics* 89: 723-728.
- CONGER B.; HENNING, G. E.; GRAY, D. J.; DANIEL J. K. L. 1983. Direct embryogenesis from mesophyll cell of orchardgrass. *Science* 221: 850-851.
- GAVISH, H. A.; FLUHR, R. 1991. Extracellular protein and early embryo development *Citrus* nucellar cell cultures. *Physiologia Plantarum* 82: 785-790.
- GMITTER, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. 1990. Induction of triploid. *Citrus* from endosperm calli *in vitro*. *Theoretical and Applied Genetics* 80 (6): 781-790.
- GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G., Jr. 1990. Protoplast fusion in *Citrus* improvement. *Plant Breed. Rev.* 8: 339-474.
- HIDAKA, T.; KAJIURA, Y. 1988. Plantlet differentiation from callus induced from *Citrus* embryos. *Scientia Hort.* 34: 85-92.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture: regeneration from protoplast and attempts to callus bank. *Kaju Shikejo Hokoku, B. Okitsu-Bull.. Fruit Trees Res. Stn., Series B, Okitsu* 16:1-17,
- MOORE, G. A.; JACONO, C. C.; LAWRENCE S. D.; CLINE, K. 1982. *Agrobacterium* mediated. transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 11: 238-242.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. 1969. Haplid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- PASCUAL, M.; YO, A.; CROCOMO, O. J. 1988. Effects of growth regulators on *in vitro* embryogenesis of nucelli in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Pesquina Agropecuaria-Brasileira*.
- SIM, G.E.; LOH C. S.; GOH C. J. 1988. Direct somatic embryogenesis from protoplast of *Citrus mitis* Blanco. *Plant Cell Report* 7: 418-420
- SINGH, A. K.; NITO, N.; IWAMANASA, M.; SUBHADRABYHU, S. 1991. influence of Lactosa and Glycerol on growth and somatic embryogenesis of *Citrus* callus. *Acta Horticulturæ* 321: 606-609.
- SONG, W.S.; O.H., S.D.; CHO, H.M. 1991. Plant regeneration in daugyooza (*Citrus grandis* Osbeck) through somatic embryogenesis. 2. Effect of different combination or alone of nitrogen, sources and 2,4-D on somatic embryogenesis. *Research Report of the Rural Development Administration Biotechnology* 33(2): 22-27.
- STARRANTINO, A.; CAPONNETO, P. 1990. Effect of cytokinins on embryogenic callus formation from undeveloped ovules of orange. *Acta Horticulturæ* 280: 191-194.
- STREET, H.E.; WITTERS, L.A. 1974. *Citrus*, pp. 71-100. *In: Tissue Culture and Plant Science*. H.E. Street (ed.). Academic Press. New York, USA.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVID, D. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplast and regeneration of transgenic plants. *Gene Plant Sci.* 69: 199-206
- VU, J. C. V.; NIEDZ, R. P.; YELENOSKY, G. 1993. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis embryogenesis and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus on Hamlin Sweet Orange. *Plant Cell and Organ Culture* 33: 75-80
- WALKER, K. A.; SATO, S. J. 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* the role of ammonium in somatic embryogenesis. *Plant Cell and Organ Culture*. 1: 109-121.