

REGENERACION *in vitro* MEDIANTE EMBRIOGENESIS SOMATICA DE VARIEDADES DE CITRICOS. I. OBTENCION DE CALLO FRIABLE Y SUSPENSIONES CELULARES DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis*) Y NARANJA AGRIA (*Citrus aurantium*) CULTIVADAS EN COSTA RICA^{1/}*

Víctor Manuel Jiménez **
Eric Guevara ^{2/}**

ABSTRACT

In vitro plant regeneration of citrus through somatic embryogenesis. I. Establishment of friable calli and suspension cultures of local cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis*) and sour orange (*Citrus aurantium*). Friable calli of the sweet orange cvs. 'Acosta 6' and 'Washington Navel', as well as sour orange, were initiated from immature embryos cultured *in vitro*. Formation of friable callus was observed only with the addition of a cytokinin on sweet orange cultivars and of malt extract on sour orange, respectively. Callus induction was a slow process, requiring 7 to 10 months in culture, with subcultures every month. The growth rate of calli fluctuated, showing the same behavior in all plant materials. From small quantities of friable callus, multiplication allowed obtainment of sufficient calli to start cell suspension cultures in both sweet orange cultivars, which were successfully established and maintained for four months. Power shortages that left the flasks in a stationary position for some hours induced the suspension cultures to initiate the embryogenic process, ceasing their multiplication. The factors that affect the formation of the calli and the induction of somatic embryogenesis are discussed.

INTRODUCCION

Los cítricos representan en volumen el principal producto frutícola a nivel mundial, con un total de 64,5 millones de toneladas para el período

1988-1989. Aproximadamente 35% de la producción mundial (22 millones de toneladas) se utiliza para la obtención de productos derivados de los frutos frescos (Ollitrault y Rocca-Serra, 1992).

Este cultivo es susceptible a una serie de enfermedades, plagas y condiciones adversas (edáficas, climáticas, etc.), que afectan su rendimiento. No obstante, ciertos cultivares y especies silvestres del género *Citrus* y otros emparentados, poseen cierto grado de resistencia o tolerancia contra algunos de estos factores (Vardi y Galun, 1988). Algunas de estas características pueden incorporarse a ciertos cultivares comerciales, ya que muchos de ellos son capaces de hibridarse interespecífica e intergenéricamente, lo cual es muy raro entre las especies leñosas. En vista de esto, este género es un candidato adecuado para la aplicación de programas de mejoramiento genético

1/ Recibido para publicación el 31 de marzo de 1995.

2/ Autor para correspondencia.

* Parte de la Tesis de M.Sc. presentada por el primer autor. Posgrado de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Este trabajo fue financiado parcialmente con recursos del 'German-Israel Research Agreement'.

** Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José Costa Rica. El Segundo autor es beneficiario del Programa de Apoyo a Investigadores que patrocina el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

tradicional (Grosser y Gmitter, 1990b). Sin embargo, la incorporación de una o varias de las características anteriores para el desarrollo de nuevos patrones y variedades productoras de fruto mediante hibridación sexual se ha visto limitada por varios factores, incluyendo una biología reproductiva muy compleja y períodos de juvenilidad prolongados (Grosser y Gmitter, 1990a; Grosser, 1992). Con el uso de la hibridación somática mediante fusión de protoplastos, es posible obviar algunos de estos problemas (Grosser y Gmitter, 1990b).

En todos los estudios realizados hasta ahora en regeneración y fusión de protoplastos en cítricos, la etapa más importante y limitante ha sido el establecimiento de masas de callo friable con capacidad embriogénica. El callo friable en cítricos está compuesto por conglomerados de proembriones de varios tamaños. La proliferación de este tipo de callo se da por formación, a partir de células individuales, de nuevos proembriones. Estos pueden originar a su vez embriones, aunque esta disposición afecta el crecimiento del callo, que cesa su proliferación y se orienta hacia el proceso embriogénico (Button *et al.*, 1974). La iniciación y el mantenimiento de líneas embriogénicas es generalmente muy difícil y consume mucho tiempo. Todavía no se conocen bien los requerimientos nutricionales para muchos genotipos importantes (Grosser y Gmitter, 1990b).

Aunque se ha logrado el establecimiento de callos friables de cítricos para muchos cultivares (Vardi y Galun, 1988), hay que tomar en cuenta que el comportamiento *in vitro* de prácticamente cualquier material vegetal se ve afectado por una serie de factores internos y externos, dentro de los cuales se pueden citar: la edad de la planta y del tejido, su estado fisiológico, así como las condiciones ambientales de cultivo (Pierik, 1987). Debido a ello, el comportamiento del material vegetal varía de una manera muy amplia, aún dentro de una misma especie (Drew y Smith, 1986; Pierik, 1987; Auer *et al.*, 1992), por lo que el establecimiento de un cultivar por técnicas *in vitro* requiere de una serie de estudios en condiciones locales (Sancho y Guevara, 1991).

El objetivo de este trabajo fue lograr la obtención y mantenimiento de callos friables y suspensiones celulares de naranja dulce (*Citrus sinensis* cv. 'Acosta 6' y cv. 'Washington Navel') y de naranja agria (*C. aurantium*).

MATERIALES Y METODOS

Establecimiento *in vitro* de embriones inmaduros

Se tomaron frutos jóvenes de árboles adultos de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb.) cv. 'Acosta 6' y cv. 'Washington Navel', y naranja agria (*C. aurantium* L.) y se desinfectaron en forma superficial según el procedimiento descrito por Navarro (1984) para desinfección de semillas. En condiciones asépticas, se extrajeron los embriones inmaduros según el procedimiento descrito por Vardi *et al.* (1982) y se colocaron en frascos de vidrio del tipo utilizado para comida de bebé, conteniendo diferentes medios de cultivo, todos con el pH ajustado a 5,7-5,8 y autoclavados a 121°C y 1,07 kg/cm² durante 25 min. Los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento con una temperatura de 26-30°C y un fotoperíodo de 16 h de luz (2600 lux). Seguidamente se describe con mayor detalle el protocolo utilizado con los diferentes materiales vegetales evaluados.

cv. 'Washington Navel'. En este cultivar se utilizaron frutos pequeños (1 cm de diámetro) para poder extraer los óvulos antes de que éstos degeneraran. La degradación del polen, que ocurre en 'Washington Navel' antes de la primera división meiótica, tiene como consecuencia una tasa de fertilización muy baja, ya que la polinización cruzada es muy rara en *Citrus*, al ser estrictamente entomófila (Button y Bornman, 1971).

Se extrajeron 125 embriones (tomados de un árbol proveniente de un huerto casero en Lourdes de Aguacaliente en Cartago) y se colocaron en un medio de cultivo semisólido conteniendo las sales minerales y las vitaminas de MT (Murashige y Tucker, 1969), adicionadas con 500 mg/L de extracto de malta y 5% de sacarosa (Kochba *et al.*, 1972). A las 8 semanas se realizó una transferencia al mismo medio.

Cuatro semanas después, los explantes no necrosados se colocaron en diferentes tratamientos, utilizando el medio de cultivo MT como base, con condiciones de diferentes compuestos (medios 1 al 4, del Cuadro 1).

En el siguiente subcultivo (4 semanas después) los explantes en los tratamientos 2 y 3 fueron transferidos a 2 nuevos tratamientos (5 y 6 respectivamente, del Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo evaluados.

Medio	Adiciones al medio base (MT)					Referencia
	sacarosa (%)	extracto de malta (mg/L)	adenina (mg/L)	BAP (mg/L)	AG ₃ (mg/L)	
1	5	500	-	-	-	Kochba <i>et al.</i> (1972)
2	5	500	40	-	1	Kunitake <i>et al.</i> (1991)
3	5	100	20	-	-	modificado de Kobayashi <i>et al.</i> (1983)
4	5	-	-	10	-	Kobayashi <i>et al.</i> (1990)
5	5	-	-	-	-	Vardi <i>et al.</i> (1975)
6	3	-	20	10	-	

cv. 'Acosta 6'. El material utilizado provino del árbol 76,1 situado en la colección de cítricos de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEFBM) de la Universidad de Costa Rica, situada en Alajuela. Se extrajeron 56 embriones de frutos de 3 tamaños: 1,8; 3,0 y 3,5 cm de diámetro. Se colocaron desde el inicio en los medios de cultivo 1 a 4 (Cuadro 1) y se mantuvieron en ellos por los siguientes 2 subcultivos, los cuales fueron realizados cada 4 semanas. Seguidamente, los explantes de los tratamientos 2 y 3 fueron transferidos a los tratamientos 5 y 6, respectivamente.

Naranja agria. Se extrajeron 140 embriones de frutos de 4 tamaños: 1,5; 2,0; 3,0 y 4,0 cm de diámetro (tomados de un árbol sin identificación en la EEFBM). Se cultivaron de la misma forma que se realizó para 'Acosta 6'.

En los 3 materiales vegetales estudiados, durante esta fase se transfirieron únicamente aquellos explantes que mostraron aumento de volumen, cambio de coloración, embriogénesis o cualquier respuesta de crecimiento.

Inducción de callo friable

Una vez establecidos *in vitro*, los explantes de los materiales en estudio se subcultivaron cada 4 semanas conservando sus respectivos tratamientos. En cada transferencia se seleccionaron aquellos explantes o secciones de los mismos que mostraron tendencia a la formación de callo friable, eliminando aquellos necrosados o que formaron estructuras compactas de tipo embriogénico.

Los explantes de los 3 cultivares se subcultivaron en los recipientes descritos anteriormente por un período comprendido entre 7 y 10 meses (10 meses en el caso del cv. 'Washington Navel', 7 meses en el cv. 'Acosta 6' y 8 meses en naranja agria), después de lo cual, por recomendación de J.W. Grosser (Comunicación personal. 1994. Lake Alfred, Fla., Citrus Research and Education Center (CREC) de la Universidad de Florida, Estados Unidos) fueron transferidos a platos de Petri de 10 cm de diámetro y colocados bajo un fotoperíodo de 24 h de luz. Estos se continuaron transfiriendo en las nuevas condiciones cada 4 semanas a sus respectivos medios de cultivo, siguiendo en cada transferencia con el proceso de selección descrito anteriormente.

Para cada uno de los materiales se evaluó contaminación, ausencia de crecimiento, inicio de crecimiento con posterior cese del mismo, embriogénesis y producción de callo friable.

En aquellos tratamientos en los cuales hubo formación de callo friable, se evaluó en forma mensual el porcentaje de incremento en peso fresco del material vegetal en las transferencias indicadas en la Figura 1, de la siguiente manera:

$$\% \text{ de incremento en peso fresco} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Establecimiento de suspensiones celulares

Cuando la multiplicación de callo friable permitió obtener una masa celular suficiente, se procedió a realizar el establecimiento de suspen-

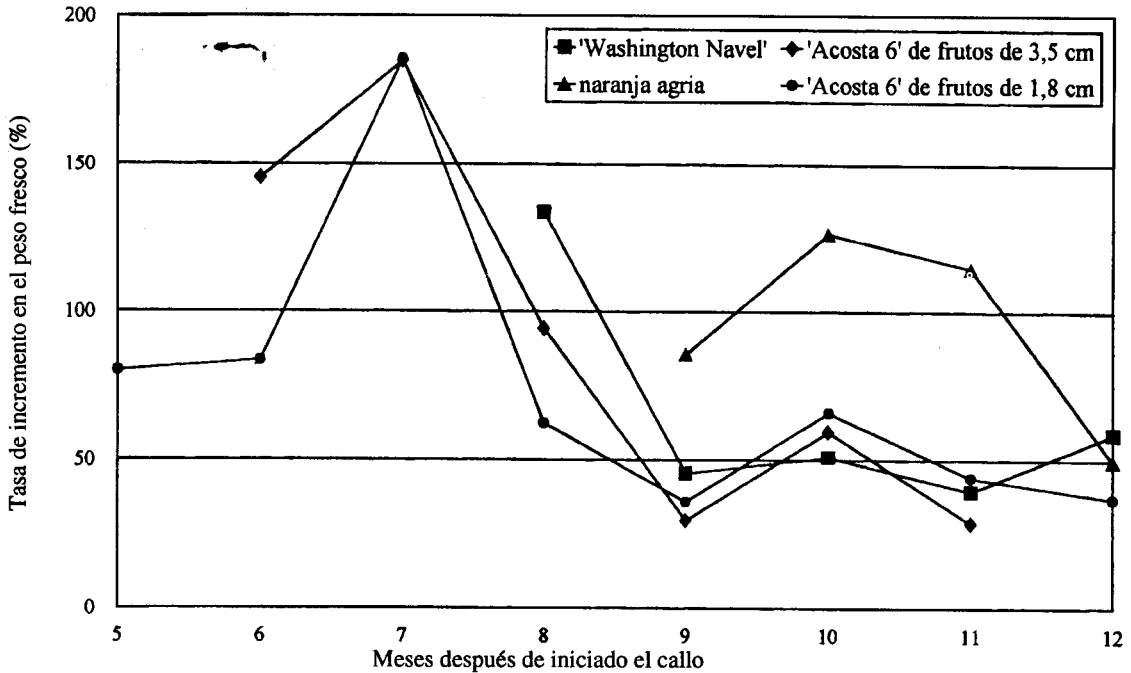


Fig. 1. Tasa de incremento en peso fresco de los callos friables de naranja dulce (cv. 'Washington Navel' y cv. 'Acosta 6') y de naranja agria.

siones celulares en 2 de los materiales utilizados. En el caso de 'Acosta 6' (proveniente de frutos de 1,8 cm), la suspensión celular se inició colocando 2 gramos (peso fresco) de callo friable en 10 ml del medio de cultivo líquido '1/2+1/2' (Grosser y Gmitter, 1990a) en un frasco erlenmeyer de 125 ml. Para 'Washington Navel', en vista de que la cantidad de callo disponible fue menor, se utilizó 1 g de callo en 5 ml del mismo medio anterior, en un frasco erlenmeyer de 50 ml. Ambos frascos se colocaron en agitación constante a 100-120 rpm con un fotoperíodo de 24 h de luz. A los 7 días se completó el volumen de medio, agregando 20 y 10 ml respectivamente.

A las 2 semanas se realizó el primer subcultivo, para lo cual se transfirieron las suspensiones a frascos erlenmeyer de mayor capacidad: 250 ml para 'Acosta 6' y 125 ml para 'Washington Navel', y se adicionaron 30 y 15 ml de medio fresco a cada uno, respectivamente.

En el siguiente subcultivo (2 semanas después), el frasco de 'Acosta 6' se agitó fuertemente y la mitad de su contenido se vertió en otro erlenmeyer de igual capacidad. Luego se completó el volumen de ambos hasta aproximadamente 60 ml con medio fresco. En el caso de 'Washington

Navel', se transfirió todo el contenido a un recipiente de 250 ml y se completó a 60 ml con medio fresco.

A partir de este momento, los subcultivos se continuaron realizando cada 2 semanas, ya sea de la manera descrita anteriormente para 'Acosta 6' (duplicándola), o bien dejando que se asentara la suspensión y eliminando aproximadamente 30 ml de medio y completando de nuevo a 60 ml con medio fresco (no duplicándola). Se subcultivaron únicamente aquellas suspensiones que se encontraban en mejor estado.

Determinación de la tasa de crecimiento de las suspensiones

Con la finalidad de determinar el efecto de duplicar y no duplicar la suspensión al momento de la transferencia, se realizaron determinaciones de la tasa de incremento en el volumen de células compactas (VCC) de suspensiones de 'Acosta 6' duplicadas y no duplicadas. Estas mediciones se realizaron de la séptima a la octava transferencia, de la octava a la novena, y de la novena a la décima.

El VCC se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Hall (1991) con ligeras modi-

ficaciones: se agitó fuertemente la suspensión celular y se tomó una alícuota (2,5-3,5 ml) con una pipeta de boca ancha, se colocó en un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugó por 5 min a 500 X g. El VCC se calculó de la siguiente manera:

$$\text{VCC} = \frac{\text{volumen de masa celular} \times 100}{\text{volumen de la muestra}}$$

La tasa de incremento en el VCC se obtuvo determinando el VCC una vez realizada la transferencia, y antes de la siguiente, como sigue:

$$\% \text{ de incremento en VCC} = \frac{\text{VCC final} - \text{VCC inicial} \times 100}{\text{VCC inicial}}$$

RESULTADOS

Inducción y multiplicación de callo friable

Inicialmente los explantes en cultivo mostraron uno de los siguientes comportamientos: aumento en volumen y formación de pequeños embriones verdes, aumento en volumen y formación de callo compacto, o ausencia de cambio. Después de 2 subcultivos en los medios 1, 2, 3 y 4, sólo en los tratamientos 2 y 3 no se observó crecimiento en ninguno de los explantes, por lo que se transfirieron a los medios 5 y 6. Algunos de los explantes que crecieron dejaron de hacerlo y permanecieron estáticos durante el resto del período de evaluación.

El cambio en el recipiente de cultivo (de frasco para comida de bebé a plato de Petri) y de las condiciones lumínicas (de 16 a 24 h de luz) estimuló la formación de callo friable en los 3 materiales evaluados. Este se inició como pequeños 'brotes' en la superficie de los tejidos en creci-

miento (principalmente callos compactos). Una vez aislados, estos 'brotes' crecieron en forma más vigorosa que al permanecer unidos al tejido que les dio origen.

Como se observa en el Cuadro 2, al cabo de 16 meses de cultivo (6 en platos de Petri) la mayoría de los explantes de 'Washington Navel' no mostraron ninguna respuesta, y en general en casi todos los que iniciaron crecimiento, éste cesó posteriormente. Sólo un porcentaje bajo (3 a 7% de los explantes) presentó embriogénesis, y únicamente en el tratamiento 6 se observó la formación de callo friable a partir de un explante. En este último medio se obtuvo la mayor frecuencia de embriogénesis.

En el caso del cv. 'Acosta 6', a diferencia del cv. 'Washington Navel', la mayoría de los explantes presentaron crecimiento inicial, el cual, sin embargo, cesó posteriormente (Cuadro 3). El tratamiento 1 fue el que tuvo mayor efecto en la inducción de embriones, seguido del 6. No se observó relación determinante entre el tamaño del fruto y la expresión de la embriogénesis, ya que en el tratamiento 1 ésta se manifestó principalmente con frutos de 1,8 cm (40%), mientras que en el tratamiento 6 lo fue con frutos de tamaño igual o superior a 3 cm (33,3%). Únicamente se formó callo friable en el tratamiento 4, y también fue en este medio en el único en que no se observó embriogénesis; pero no se pudo evaluar la respuesta de los embriones inmaduros extraídos de frutos de 3 cm, ya que éstos se contaminaron en su totalidad.

En naranja agria (Cuadro 4) se observó una contaminación más alta que en los dos cultivares de naranja dulce, particularmente en los explantes provenientes de frutos de mayor tamaño. Debido a esto, no se pudo apreciar en esta especie el efecto del tamaño del fruto sobre la embriogénesis. Toda la contaminación observada en los estados iniciales se originó a partir de los explantes y aparente-

Cuadro 2. Comportamiento de embriones inmaduros del cv. 'Washington Navel' en diferentes medios, después de 6 meses de cultivo en platos de Petri.

Medio de cultivo	% de contaminación	Número de explantes no contaminados	Respuesta observada (en %)			
			Sin crecimiento	Cese de crecimiento	Embriogénesis	Callo friable
1	12,50	21	85,71	9,52	4,76	0,00
5	0,00	31	77,42	19,35	3,23	0,00
6	0,00	29	68,97	20,69	6,90	3,45
4	0,00	31	64,52	35,48	0,00	0,00

Cuadro 3. Comportamiento de embriones inmaduros del cv. 'Acosta 6' extraídos de frutos de 3 tamaños, en diferentes medios después de 6 meses de cultivo en platos de Petri.

Medio de cultivo	Diámetro de frutos (cm)	% de contaminación	No. de explantes no contaminados	Respuesta observada (en %)			
				Sin crecimiento	Cese crecimiento	Embriogénesis	Callo friable
1	1,8	0	5	20	40	40	0
	3,0	14	6	0	100	0	0
	3,5	0	7	28	57	14	0
5	1,8	0	6	0	83	16	0
	3,0	0	6	0	83	16	0
	3,5	14	6	0	83	16	0
6	1,8	16	5	0	80	20	0
	3,0	50	3	0	66	33	0
	3,5	14	6	0	66	33	0
4	1,8	0	6	33	50	0	16
	3,0	100	0				
	3,5	77	2	0	50	0	50

Cuadro 4. Comportamiento de embriones inmaduros de naranja agria extraídos de frutos de 4 tamaños, en diferentes medios después de 6 meses de cultivo en platos de Petri.

Medio de cultivo	Diámetro de frutos (cm)	% de contaminación	No. de explantes no contaminados	Respuesta observada (en %)			
				Sin crecimiento	Cese crecimiento	Embriogénesis	Callo friable
1	1,5	0	6	16	66	16	0
	2,0	66	2	50	50	0	0
	3,0	66	4	0	50	25	25
	4,0	83	2	0	100	0	0
5	1,5	0	6	33	0	66	0
	2,0	16	5	20	0	80	0
	3,0	66	4	25	50	25	0
	4,0	91	1	0	0	100	0
6	1,5	16	5	0	60	40	0
	2,0	100	0				
	3,0	50	6	0	66	33	0
	4,0	83	2	0	100	0	0
4	1,5	0	4	50	50	0	0
	2,0	100	0				
	3,0	75	3	33	0	66	0
	4,0	70	3	100	0	0	0

mente fue causada por bacterias. El tratamiento 5 fue el que estimuló en mayor medida la formación de embriones somáticos. Únicamente en el tratamiento 1 hubo desarrollo de callo friable y con frutos de 3,0 cm, aunque a partir de 2 embriones sobrevivientes, procedentes de frutos de 4,0 cm de diámetro, en este mismo tratamiento se desarrolló un tejido con apariencia de callo friable, que sin embargo, cesó su crecimiento y comenzó a oxidarse después de 5 subcultivos.

Se observó mayor formación de embriones en el cv. 'Acosta 6' que en el cv. 'Washington Navel'; sin embargo, la tasa más alta de embriogénesis ocurrió en naranja agria. Del mismo modo, los callos friables obtenidos de esta última especie presentaron una tasa de crecimiento menor que el observado para ambos cultivares de *C. sinensis*, con un color más oscuro y formaron con más frecuencia embriones somáticos espontáneos.

En vista de que las cantidades iniciales de callo friable eran muy pequeñas, no se pudo iniciar inmediatamente las determinaciones de peso fresco. Fue por eso que a los callos del cv. 'Acosta 6' obtenidos de frutos de 1,8 cm, la determinación del porcentaje de incremento en peso fresco se empezó en el intervalo de 4-5 meses después del inicio en la formación del callo friable (Figura 1); a los del cv. 'Acosta 6' de frutos de 3,5 cm un mes después; y así sucesivamente para los otros materiales.

Se observó en todo momento (Figura 1) un aumento en el peso fresco de los callos de los 3 cultivares evaluados. Las tasas de incremento se comportaron en forma similar en todos los materiales, en el sentido de que aumentaron y disminuyeron en forma coincidente en cada transferencia, con excepción de la última evaluación. Las mayores tasas de incremento en los pesos frescos se observaron en los 2 materiales de 'Acosta 6', entre los 6 y 7 meses de cultivo después del inicio de la formación de callo friable, mientras que en 'Washington Navel' fue entre los 7 y 8 meses, y para naranja agria entre los 9 y 10 meses.

Una vez formado el callo friable, se observó que la manera de realizar las transferencias influyó en su crecimiento. Así, cuando los callos que habían alcanzado cierto tamaño se dividieron en segmentos más pequeños, el aumento en volumen observado fue mucho mayor que cuando el callo se transfirió completo. Lo mismo ocurrió cuando en las transferencias se extendió el callo con mayor fuerza sobre el medio de cultivo, haciendo que ocurra mayor superficie.

En todos los cultivares se observó la formación espontánea de embriones somáticos en algunos de los callos friables. Si estos embriones no eran eliminados rápidamente, su presencia estimulaba la proliferación de más embriones en el tejido circundante.

Nueve meses después de que se dieron las primeras manifestaciones de formación de callo friable se habían obtenido 15,18 g (peso fresco) del mismo en el cv. 'Acosta 6' proveniente de frutos de 1,8 cm; 4,99 g del cv. 'Acosta 6' de frutos de 3,5 cm; 11,38 g del cv. 'Washington Navel' y 0,91 g de naranja agria. Estos valores no toman en cuenta la cantidad de callo que se tomó para iniciar las suspensiones celulares.

Establecimiento y cultivo de las suspensiones celulares

Se lograron establecer en forma exitosa suspensiones celulares a partir de callo friable de los cultivares 'Washington Navel' y 'Acosta 6' (de frutos de 1,8 cm de diámetro), ya que fueron los únicos de los cuales se dispuso de suficiente cantidad de material vegetal.

El medio de cultivo '1/2+1/2' sugerido por Grosser y Gmitter (1990a) mostró ser adecuado para la proliferación y mantenimiento de las suspensiones obtenidas. Al final de cada período de cultivo de 2 semanas y previo a su transferencia, se observó en las suspensiones obtenidas 2 tipos de respuesta, lo cual determinó la forma de efectuar los subcultivos. Aquellas suspensiones que mostraron mayor crecimiento y por lo tanto una mayor densidad de células se subcultivaron dividiendo la masa celular, mientras que aquellas cuyo crecimiento fue bajo y tenían menor densidad celular, simplemente se les renovó parte del medio de cultivo. Las suspensiones obtenidas se mantuvieron en forma satisfactoria por 4 meses, subcultivándolas cada 2 semanas en el mismo medio. Durante ese tiempo se observó que el cv. 'Acosta 6' tuvo un crecimiento más vigoroso que el cv. 'Washington Navel'.

A partir de los 4 meses de cultivo, y coincidiendo con un período de cortes frecuentes y prolongados en el fluido eléctrico en el laboratorio, algunas suspensiones manifestaron cambio en su coloración, pasando de un color crema (apariencia normal de la suspensión) a amarillo pardo; y se observó la formación de agregados celulares más compactos. Estos cambios coincidieron con una

Cuadro 5. Porcentaje de incremento en el volumen de células compactas (VCC) para 3 transferencias de suspensiones celulares de naranja dulce cv. 'Acosta 6', duplicadas (desde el inicio del experimento) y no duplicadas (a partir de la sexta transferencia).

No. de transferencia	Tipo de transferencia realizada	
	Duplicadas	No duplicadas
7-8	106,11	64,60
8-9	92,71	-10,41
9-10	36,45	35,10

disminución del volumen celular en los frascos. Un mes después se observó la formación de pequeños embriones en la suspensión y en 30 días prácticamente todo el material inició embriogénesis.

La determinación del porcentaje en el incremento del volumen de células compactas (VCC) se realizó con el cultivar 'Acosta 6' a partir de la séptima transferencia (Cuadro 5). Se observan tasas altas de aumento en las transferencias 7 y 8 de las suspensiones duplicadas al transferir. Por el contrario, en las suspensiones no duplicadas se obtuvieron valores inferiores, e incluso se observó en las transferencias 8-9 la disminución en los valores absolutos del VCC. En la tercera evaluación se encontró similitud en los valores obtenidos, los cuales coinciden con el período de cortes en el flujo eléctrico mencionado anteriormente.

DISCUSION

Inducción y multiplicación de callo friable

Aunque la producción de embriones adventicios en cítricos es un proceso independiente de la polinización y fertilización, el desarrollo de estos embriones depende en gran medida de que haya ocurrido esta última, ya que la degradación del endospermo en ausencia de la fertilización limita seriamente su desarrollo (Wanaka y Uemoto, 1987). En el cv. 'Washington Navel' la mayoría de los explantes no crecieron (Cuadro 2), contrario a lo ocurrido en 'Acosta 6' y naranja agria (Cuadros 2 y 3), en los cuales se observó un crecimiento inicial. La causa de esto puede estar relacionada con el fenómeno descrito anteriormente, ya que aunque el medio de cultivo provee gran cantidad de sustancias nutritivas a los embriones adventicios para su desarrollo, éstos se encuentran limitados en cuanto al aporte de metabolitos de reserva, contrario a lo que ocurre en aquellos cultivares o especies en los que hay polinización, fertilización y por lo tanto desarrollo del endospermo.

En el cv. 'Acosta 6' y en naranja agria se utilizaron frutos de varios tamaños con la finalidad de evaluar su efecto sobre la formación de callo friable *in vitro* (Cuadros 2 y 3). Sin embargo la poca cantidad de explantes disponibles al momento de realizar la inoculación, sumado a los problemas de contaminación en algunos de los tratamientos no permitieron concluir al respecto.

El hecho de que la formación de callo friable se inició al transferir los explantes a los platos de Petri, probablemente se debió al menor volumen de éstos, y una mayor limitación del intercambio gaseoso entre el interior y el exterior, fenómeno que ha influido en el comportamiento *in vitro* de ciertas especies (McClelland y Smith, 1990). Estos factores afectan directamente la concentración de los compuestos gaseosos en el interior de los recipientes (Pierik, 1987). El 'cierre' de los frascos de cultivo utilizados inicialmente estaba constituido por una lámina de plástico transparente (del tipo utilizado para envolver alimentos), muy permeable a los gases, lo cual probablemente impidió su acumulación en el interior del recipiente y favoreció una mayor pérdida de humedad. Lo contrario ocurrió en los platos de Petri, con lo cual el efecto ejercido por los gases acumulados sobre el material vegetal fue más evidente. Puede entonces considerarse la siguiente secuencia de eventos. De manera inicial se produjo el acúmulo del CO₂ producto del metabolismo celular, el cual estimula la actividad de la enzima ACC oxidasa, clave en la biosíntesis del etileno (Poneleit y Dilley, 1993). Las altas concentraciones de este gas liberadas por los callos (Pierik, 1987) inhibieron la embriogénesis en naranja dulce, sin afectar desfavorablemente su crecimiento (Kochba *et al.*, 1978). Si se toma en cuenta, tal y como se mencionó anteriormente, que embriogénesis y proliferación de callo friable en cítricos son procesos mutuamente excluyentes, esta acumulación de etileno pudo favorecer el crecimiento del callo por proliferación de proembriones.

El cambio en el fotoperíodo pudo también afectar el comportamiento observado. Algunas especies requieren de luz para la formación del callo, mientras que en otras el efecto promotor es la oscuridad completa (Pierik, 1987). Vardi *et al.* (1982) indujeron callo friable en 7 especies y cultivares de cítricos utilizando un fotoperíodo de 16 h de luz. Por su parte, Ling *et al.* (1990) obtuvieron resultados similares en mandarina 'Satsuma' utilizando oscuridad completa.

Los 2 cultivares de naranja dulce respondieron de diferente forma a los medios de cultivo utilizados. En el caso de 'Washington Navel', la respuesta obtenida varió con respecto a lo informado por Button y Bornman (1971), quienes lograron obtener callo en pequeñas cantidades utilizando medio adicionado con adenina y extracto de malta, sin necesidad de agregar citoquininas. Los medios de cultivo en los cuales se formó callo friable en 'Acosta 6' y 'Washington Navel' contienen citoquininas o precursores de éstas, como es el caso de la adenina. Se ha informado de la obtención de callo friable en naranja dulce adicionando adenina (Kobayashi *et al.*, 1983) y BAP (Kobayashi *et al.*, 1990) al medio de cultivo. Kochba y Spiegel-Roy (1977) observaron además que el BAP inhibió la embriogénesis espontánea en callos originados a partir de óvulos de *C. sinensis* 'Shamouti'. Estos autores propusieron que las citoquininas retardaban la senescencia de los tejidos, evitando un envejecimiento prematuro de los mismos, y posiblemente disminuyendo su potencial embriogénico. Aparte de su efecto directo, se ha encontrado en varias especies que las citoquininas promueven la producción de etileno en ciertos tejidos (Yip y Yang, 1986; Li y Bangerth, 1991), cuyos posibles efectos se discutieron previamente.

La formación de callo friable en naranja agria se observó en un medio desprovisto de reguladores de crecimiento y con extracto de malta. Esta sustancia es una mezcla de compuestos utilizada como fuente alterna de nitrógeno orgánico, que a la vez contiene vitaminas y aminoácidos (Pierik, 1987). Se ha utilizado con éxito para inducir callo friable a partir de varios cultivares y especies de cítricos (Button y Bornman, 1971; Kochba *et al.*, 1972; Vardi *et al.*, 1982; Gentile *et al.*, 1993). Kochba *et al.* (1972) observaron que el extracto de malta favoreció la embriogénesis en cultivos nucelares.

Es probable que el patrón observado en la determinación del incremento en peso fresco de los callos friables (Figura 1), sea causado más por

la manera de cultivar el material, que por sus propias características genéticas, ya que materiales muy distintos se comportaron en forma similar. En condiciones adecuadas de cultivo, la tasa de crecimiento de los callos friables es muy alta, especialmente cuando éstos no son de gran tamaño, con lo cual la relación de la superficie del callo en contacto con el medio y su volumen es elevada, y por lo tanto hay una alta absorción de nutrimentos y metabolitos por parte de la mayoría de las células. Conforme aumenta el tamaño de los callos en cultivo esta relación va disminuyendo, lo cual limita el crecimiento y división de muchas de las células que no están en contacto con el medio, un aspecto observado a partir de la quinta transferencia (Figura 1). El comportamiento intermitente de aumento y disminución del crecimiento a partir del noveno mes de cultivo, probablemente se debió a la manipulación a la que fue sujeto el material a partir de ese momento para la iniciación de suspensiones celulares.

La formación espontánea de embriones somáticos en los callos de los 3 materiales vegetales estudiados y cuya consecuencia fue una generalización del proceso embriogénico a todo el callo, puede deberse a la liberación por parte del tejido embriogénico de exudados que condicionan el comportamiento de las células cercanas. Gavish *et al.* (1991) al estudiar la presencia de proteínas extracelulares en suspensiones embriogénicas de naranja agria, encontraron en los cultivos estimulados hacia la embriogénesis niveles bajos de una glicoproteína de 53-57 kDa. Además detectaron la presencia de una proteasa de 50 kDa y otras 4 proteínas extracelulares no presentes en suspensiones no estimuladas. El modo de acción y otros efectos de estas proteínas todavía no se comprende en detalle. Sin embargo, sus niveles de concentración, presencia y ausencia pueden tener relación con la inducción en los tejidos cercanos hacia la embriogénesis. La importancia de extraer los embriones formados radica en que los procesos de multiplicación de callo friable (formación de proembriones) y de embriogénesis no pueden ocurrir en forma simultánea, sino que cualquiera de ellos inhibe al otro (Button *et al.*, 1974), y por lo tanto la inducción de la embriogénesis reduciría la tasa de crecimiento del callo friable. Es por esta razón que no fue posible establecer suspensiones celulares a partir de naranja agria, debido a la alta formación espontánea de embriones somáticos, por lo que no se dispuso de suficiente callo friable.

Establecimiento y cultivo de las suspensiones celulares

El medio de cultivo utilizado para el establecimiento y mantenimiento de las suspensiones no tiene reguladores de crecimiento, posee niveles bajos de amonio y utiliza glutamina como fuente parcial de nitrógeno. Los cultivos celulares en cítricos, a diferencia de lo que ocurre con otros sistemas semejantes, mantienen su estado no embriogénico sin necesidad de la adición externa de reguladores de crecimiento (Kochba y Spiegel-Roy, 1977).

El comportamiento observado en las suspensiones de 'Acosta' y 'Washington Navel' después de 4 meses de cultivo, está probablemente relacionado con el cese frecuente de la agitación debido a cortes en el fluido eléctrico ocurridos en ese momento. Bangerth (1995, Stuttgart, Alemania, Universidad de Hohenheim. Comunicación personal) propone que la formación de un gradiente polar de auxinas induce la simetría bilateral característica de las primeras etapas de la embriogénesis. Es muy difícil que ocurra polarización en cultivos en agitación constante; sin embargo, su cese pudo permitir la formación del gradiente, y en consecuencia que se diera el estímulo embriogénico. También el cese en la agitación disminuyó la incorporación de oxígeno al medio y por lo tanto restringió su disponibilidad a los explantes. Thorpe (1982) menciona que niveles bajos de oxígeno disueltos en medio de cultivo líquido favorecen el desarrollo de embriogénesis somática en zanahoria y otros cultivos.

Estos resultados se ven confirmados en la evaluación del VCC hecha a las suspensiones. Durante la primera evaluación los cultivos duplicados doblaron su VCC debido a que la forma de realizar la transferencia permite que se mantenga una densidad celular adecuada. Por el contrario, en las no duplicadas la disminución observada se debe probablemente a efectos de competencia celular por factores necesarios para su adecuado crecimiento (oxígeno, azúcares, nutrimentos, etc.). La renovación del medio evita que estos factores estén en cantidades limitantes, aunque al haber mayor cantidad de tejido el consumo de estos compuestos es mayor y por lo tanto se agotan con mayor rapidez, lo cual concuerda con las observaciones hechas por King y Street (1977), a saber, que pequeños incrementos en la densidad celular en suspensiones con densidades celulares altas,

producen reducciones grandes en su tasa de incremento. En la segunda evaluación, la disminución sufrida en el VCC es atribuible al hecho de que en ese momento se inició el proceso embriogénico, debido a los cortes en el fluido eléctrico anteriormente mencionados, y por lo tanto ocurrió la producción de células más pequeñas con citoplasma denso, que caracterizan los primeros estados de la embriogénesis, en lugar de las células de gran tamaño y altamente vacuoladas propias de las suspensiones celulares. En esta misma evaluación, en las células no duplicadas se llegó al cese en la división y crecimiento indiferenciado, también observado por King y Street (1977) al seguir cultivando las suspensiones a densidades superiores a las máximas. Durante la tercera evaluación, la similitud en las tasas de incremento del VCC son debidas al crecimiento de los embriones. La rápida manifestación del proceso embriogénico no es común en las suspensiones celulares de cítricos. De hecho, suspensiones celulares provenientes del CREC de la Universidad de Florida, cultivadas bajo las mismas condiciones que los materiales locales y que sufrieron el mismo proceso de cese de agitación, no expresaron embriogénesis somática en estado de suspensión celular (resultados no publicados). Estas últimas tienen mayor tiempo de cultivo (más de 2 años), en comparación con las suspensiones celulares de 'Acosta 6' y de 'Washington Navel', lo que podría explicar las diferencias observadas. A pesar de que las suspensiones celulares originadas a partir de callo friable embriogénico de cítricos pueden permanecer en estado indiferenciado por períodos prolongados de tiempo (incluso por varios años) mientras se mantengan en condiciones adecuadas (Vardi *et al.*, 1982; y Gavish *et al.*, 1991), su habilidad para iniciar embriogénesis y regenerar plantas con características normales se ve seriamente reducida con el tiempo de cultivo (Comunicación personal. J. W. Grosser, 1994. Lake Alfred, Estados Unidos). Se ha visto que en callos y suspensiones celulares jóvenes ocurre acumulación de almidón, el cual disminuye en forma paulatina con la edad del cultivo, lo que dificulta la inducción embriogénica. Es tal vez por esta razón que el estímulo embriogénico se manifestó con mayor intensidad en las suspensiones de 'Acosta 6' y 'Washington Navel', de más reciente establecimiento *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron la obtención de callos friables y suspen-

siones celulares de algunos materiales de cítricos establecidos en Costa Rica. Esto abre la posibilidad para extender la aplicación de estas técnicas a diversos cultivares existentes en el país que posean características de interés para programas de mejoramiento vegetal. El establecimiento de estas líneas podría permitir el aislamiento de protoplastos, y eventualmente la fusión de los mismos con otros aislados a partir de hojas o algún otro tejido que cumpla con los requerimientos para un programa de selección a nivel celular. Se podrían así crear nuevas variedades, mejor adaptadas a nuestras condiciones de cultivo.

RESUMEN

Se realizó el establecimiento *in vitro* de callos friables a partir de embriones inmaduros de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb. cvs. 'Acosta 6' y 'Washington Navel') y naranja agria (*C. aurantium* L.). Se evaluó además la capacidad de los cultivos obtenidos para iniciar suspensiones celulares. La formación de callo friable se logró en presencia de citoquinina en los cultivares de naranja dulce, y de extracto de malta en naranja agria. La obtención de callo fue un proceso lento, se necesitaron entre 7 y 10 meses, con subcultivos cada mes. La tasa de crecimiento de los callos presentó un comportamiento fluctuante, similar en todos los materiales estudiados. La multiplicación de pequeñas cantidades de callo friable permitió obtener suficiente material para iniciar suspensiones celulares, que se subcultivaron en forma exitosa por 4 meses. Ceses frecuentes y prolongados en la agitación de las suspensiones celulares indujeron embriogénesis en las mismas y limitaron su proliferación. Se discuten los factores que afectan los procesos de formación de callo y del inicio de la embriogénesis somática.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a Maritza Guerrero y Griselda Arrieta por la colaboración brindada.

LITERATURA CITADA

AUER, C.A.; COHEN, J.D.; LALOUE, M.; COOKE, T.J. 1992. Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiol.* 98:1035-1041.

BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington Navel orange *in vitro*. *J.S. Afr. Bot.* 37(2):127-134.

BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. 1974. Fine structure of embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamout' orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J. Exp. Bot.* 25(85):445-475.

DREW, R.A.; SMITH, N.G. 1986. Growth of apical and lateral buds of papaya (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *J. Hort. Sci.* 61(4):535-543.

GAVISH, H.; VARDI, A.; FLUHR, R. 1991. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. *Physiol. Plant.* 82:606-616.

GENTILE, A.; TRIBULATO, E.; DENG, Z.N.; GALUN, E.; FLUHR, R.; VARDI, A. 1993. Nucellar callus of 'Femminello' lemon, selected for tolerance to *Phoma tracheiphila* toxin, shows enhanced release of chitinase and glucanase into the culture medium. *Theor. Appl. Genet.* 86:527-532.

GROSSER, J.W.; GMITTER, Jr., F.G. 1990a. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Rev.* 8:339-374.

GROSSER, J.W.; GMITTER, Jr. F.G. 1990b. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *HortScience* 25(2):147-151.

GROSSER, J.W. 1992. The role of biotechnology in the development of improved *Citrus* scion and rootstock cultivars. *In* Transactions of the 1992 Citrus Engineering Conference. Florida Section of the American Society of Mechanical Engineers 38:24-37.

HALL, R.D. 1991. The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. *In* Plant Tissue Culture Manual. Ed. by K. Lindsey. Dordrecht, Holanda, Kluwer. A3:1-21.

KING, P.J.; STREET, H.E. 1977. Growth patterns in cell cultures. *In* Plant Tissue and Culture. Ed. by H.E. Street. 2 ed. Oxford, U.K., Alden. p. 307-387.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H.; IKEDA, I. 1983. Plant regeneration from 'Trovita' orange protoplasts. *Japan. J. Breed.* 33(2):119-122.

KOBAYASHI, S.; SAKAI, A.; OIYAMA, I. 1990. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 23:15-20.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. *Planta* 106:237-245.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. 1977. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habitua-

- ted ovular callus of the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.* 81:283-288.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. 1978. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, Ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 89:427-432.
- KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsum' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Sci. Hort.* 47:27-33.
- LI, C.J.; BANGERTH, F. 1991. The possible role of cytokinins, ethylene and indoleacetic acid in apical dominance. *In Progress in Plant Growth Regulation.* Ed. by C.M. Karssen, L.C. van Loon, D. Vreugdenhil. Dordrecht, Holanda, Kluwer. p. 431-436.
- LING, J.-T.; NITO, N.; IWAMASA, M.; KUNITAKE, H. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of Satsuma. *HortScience* 25:970-972.
- MCCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L. 1990. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience* 25:797-800.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc. First Intl. Citrus Symp.* 3:1155-1161.
- NAVARRO, L. 1984. Citrus tissue culture. *In Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus, and ornamental species. Proceedings FAO/NORWAY symposium on plant tissue culture, technology and utilization.* FAO Plant Production and Protection Paper 59. p. 113-154.
- OLLITRAULT, P.; ROCCA-SERRA, D. 1992. L'amélioration des agrumes: II-Creation varietales et biotechnologies. *Fruits* 47:124-134.
- PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda. 344 p.
- PONELEIT, L.S.; DILLEY, D.R. 1993. Carbon dioxide activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology* 3:191-199.
- SANCHO, G.; GUEVARA, E. 1991. El cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.). I. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la contaminación inicial de explantes. *Bol. Téc. Est. Exp. Fabio Baudrit (Costa Rica)* 24(1):14-25.
- THORPE, T.A. 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. *In Tissue Culture in Forestry.* Ed. by J.M. Bonga, D.J. Durzan. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, Holanda. p. 325-368.
- VARDI, A.; SPEIGEL-ROY, P.; GALUN, E. 1975. *Citrus* cell culture: isolation of protoplasts, planting densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Sci. Lett.* 4:321-236.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.* 62:171-176.
- VARDI, A.; GALUN, E. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. *Sci. Hort.* 37:217-230.
- WANAKA, A.; UEMOTO, S. 1987. Adventive embryogenesis in *Citrus*. I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *Amer. J. Bot.* 74:517-530.
- YIP, W.-K.; YANG, S.F. 1986. Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems. *Plant Physiol.* 80:515-519.