

Ensayos de endospermo artificial para embriones de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan)

N. Nieves*, J.C. Lorenzo*, M. Blanco*, J. González*,
E. Borroto*, O. Concepción*, Z. Fundora*, C.G. Borroto*

RESUMEN

Los experimentos de endospermo artificial realizados con embriones naturales de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) demostraron que la concentración de ácido abscísico (ABA) de 10-6 M provocó retraso en la germinación y conversión de los embriones naturales; los aminoácidos aceleraron el proceso de conversión mientras que el manitol lo inhibió y ninguna de las fuentes de almidón (papa, maíz y arroz) probadas, logró la conversión de los embriones de mandarina Cleopatra.

Palabras clave: Semilla artificial, ácido abscísico, ácido giberélico, carbohidratos, aminoácidos.

ABSTRACT

Artificial endosperm assays in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort ex Tan) showed that abscisic acid (ABA) (10-6 M) delayed germination and conversion of natural embryos; the amino acids accelerated the process of conversion, while the mannitol inhibited this process. None of the starch sources (potato, corn and rice) achieved conversion of encapsulated embryos.

INTRODUCCIÓN

La semilla artificial en patrones de cítricos no tiene importancia económica aparente, ya que produce gran número de semillas con un alto grado de poliembrionía, carácter muy explotado en la propagación de las plantas empleadas como patrones (Campos 1986). Sin embargo, el trabajo para la obtención de la semilla artificial en los cítricos se relaciona con los grupos de mejoramiento genético. La producción de estas semillas artificiales es importante para facilitar el uso de las pocas plantas mejoradas que se obtienen mediante estos programas.

La propagación acelerada de las plantas con germoplasma elite resulta más ventajosa utilizando semilla artificial como método de propagación, por la rapidez de multiplicación y el alto volumen y bajo costo de este método con relación a otros (propagación por estacas, micropropagación) (Castillo 1992).

La semilla artificial es un análogo de la semilla verdadera y está constituida por los siguientes elementos: embrión somático, gel nutriente

específico de los cítricos, (endospermo artificial) y polímero de recubrimiento. El embrión somático es la estructura viva que dará origen a la planta —gel nutriente— que, en el caso desempeña el papel de los cotiledones; y el polímero de recubrimiento es la película que evita la desecación de la semilla, pero que a la vez permite el intercambio gaseoso.

En este trabajo se recogen resultados relacionados con experimentos de endospermos artificiales con embriones naturales de mandarina Cleopatra con el objetivo de conformar el endospermo de la semilla sintética

MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los experimentos se emplearon semillas procedentes de frutos maduros, de las que se extrajeron las semillas. Antes de su empleo, en la mesa de flujo laminar, se les eliminó la testa; se sumergieron en una solución de Ca(ClO)₂ 1% durante 10 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Los embriones desnudos, despojados de sus cotiledones, se colocaron en medios de cultivo solidificados con agar (0.8%), cuya composición varió según el experimento específico.

¹ Recibido el 17 de agosto de 1994
Centro de Bioplasmas, Instituto Superior Agrícola, Carretera Morón km 9 (CP 69450), Ciego de Avila, Cuba.

Se evaluó el porcentaje de germinación y conversión en cada uno de los experimentos, considerándose un embrión convertido cuando al menos tenía una hoja.

Experimento 1.

Efecto de la sacarosa, el almidón y la relación ácido giberélico (AG3) - ácido abscísico (ABA)

Se sembraron embriones sobre agua con agar (0.3%) y las variantes que aparecen en el Cuadro 1. Dichas variantes tenían como medio basal: sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), vitaminas de Murashige y Tucker (MT) (1969) y 100 mg/l inositol.

Cuadro 1. Diseño de los tratamientos para probar el efecto de la fuente de carbono y el balance hormonal.

Fuente de carbono	Balance hormonal
Almidón de maíz (1.5%)	Sin hormonas
	10^{-8} M ABA / 10^{-6} AG ₃
	10^{-6} M ABA / 10^{-6} AG ₃
	10^{-6} M ABA / 10^{-8} AG ₃
Sacarosa (5%)	Sin hormonas
	10^{-8} M ABA / 10^{-6} AG ₃
	10^{-6} M ABA / 10^{-6} AG ₃
	10^{-6} M ABA / 10^{-8} AG ₃

Experimento 2.

Efecto de la sacarosa, el almidón y la relación AG3 - sustitutos del ABA

Como medio basal se utilizaron los mismos componentes del experimento anterior. Manteniendo el AG3 en 10^{-6} M, se hicieron pruebas de sustitutos del ABA (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño de los tratamientos para probar el efecto de la fuente de carbono y los sustitutos del ABA.

Fuente de carbono	Sustitutos del ABA
Almidón de maíz (1.5%)	prolina (115 mg/l)
	glutámico (8 mg/l) + arginina (6 mg/l)
	manitol (45.5×10^3 mg/l)
	prolina (115 mg/l)
	glutámico (8 mg/l) + arginina (6 mg/l)
	manitol (45.5×10^3 mg/l)

Experimento 3.

Efecto de la fuente de almidón y su concentración

Se utilizó el mismo medio basal que en el experimento 1 y se probaron los tratamientos que aparecen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Diseño de los tratamientos para probar el efecto de la fuente de almidón y su concentración.

Fuente de carbono	Concentración (%)
Almidón de papa	0.6
	0.8
	1.0
Almidón de maíz	0.6
	0.8
	1.0
Almidón de arroz	0.6
	0.8
	1.0
Sacarosa	5.0
Sin fuente de carbono	0.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Efecto de la sacarosa, el almidón y la relación ácido giberélico (AG3) - ácido abscísico (ABA)

En la Fig. 1a,b,c,d se muestran los resultados del experimento suplementado con sacarosa al 5%, ya que con el almidón de maíz al 1.5% no se logró la germinación de los embriones, independientemente de los suplementos hormonales. Como se aprecia las combinaciones sin hormonas y ABA < AG3 alcanzaron el 100% de germinación a los siete días de iniciado el cultivo, mientras que ABA = AG3 y ABA > AG3, aunque lograron también que germinara el 100% de los embriones, lo completaron con cierto retraso, o sea, a los 14 días.

En cuanto a la conversión, la combinación de ABA > AG₃ inició primero el proceso a los 21 días, pero todos los embriones no lograron convertir y hubo un descenso posterior provocado por la muerte de un 5% de los mismos. El tratamiento sin hormonas comenzó a convertir siete días después del

suplemento con mayor contenido de giberelinas y a los 35 días todos convirtieron a plantulitas. En la combinación con los más altos niveles del inhibidor, la conversión se inició también a los 28 días, pero este proceso resultó más lento, puesto que a los 42 días es que se estabiliza la curva y no se logra la conversión del 100% de los embriones. El tratamiento con mayor retraso en el comienzo de la conversión es el de iguales concentraciones de ABA y AG₃, que inicia a los 35 días y a los 49 días presenta sólo el 95% de convertidos.

Redembaugh *et al.* (1987), con embriones somáticos de alfalfa, comprobaron que la mayor conversión (hasta 52%) se logró con almidón de papa hidrolizado al 1.5%; seguida por el almidón de papa soluble y el almidón de maíz, ambos al 1.5 por ciento. En el trabajo, cuando se añadió al medio el almidón de maíz a esa concentración, no se logró la germinación de los embriones naturales de cítricos, mientras que la sacarosa al 5% tuvo un efecto favorable para ambos procesos (germinación y conversión). Ello indica que los embriones naturales de cítricos no son capaces de hidrolizar el almidón y de utilizarlo como fuente de reserva energética cuando son cultivados "in vitro". Por otra parte, se ha planteado que la sacarosa desempeña dos papeles fundamentales en condiciones "in vitro": fuente de carbono y agente osmótico (Kitto y Janick 1985b).

El incremento de estrés osmótico se asocia con la plasmólisis celular (Lovey *et al.* 1975), la inhibición del crecimiento celular (Wong y Sussex 1980) y la elevación de los niveles de ABA endógeno (Lovey *et al.* 1975; Wong y Sussex 1980). De este modo, un potencial osmótico alto, impuesto por 12% de sacarosa (0.35 M), pudo incrementar el ABA endógeno así como causar hidratación del embrión asexual de zanahoria (Kitto y Janick 1985b).

Los resultados encontrados en el trabajo en el tratamiento sin hormonas evidencian que la concentración de sacarosa empleada fue incapaz de provocar un estrés que indujera niveles de ABA por encima del óptimo para inhibir la germinación, sino que favoreció los niveles endógenos del mismo y los procesos de crecimiento y desarrollo.

Al presentar igual comportamiento en la dinámica de germinación los embriones con suplemento hormonal exógeno que los tratados con el balance favorable al promotor, se evidencia que

los primeros presentaban niveles endógenos similar a la proporción del tratamiento inducido, aun cuando no se den en iguales concentraciones. En ambos

casos la acción del AG3 fue siempre superior a la del ABA, impidiéndole su efecto inhibitorio sobre la germinación.

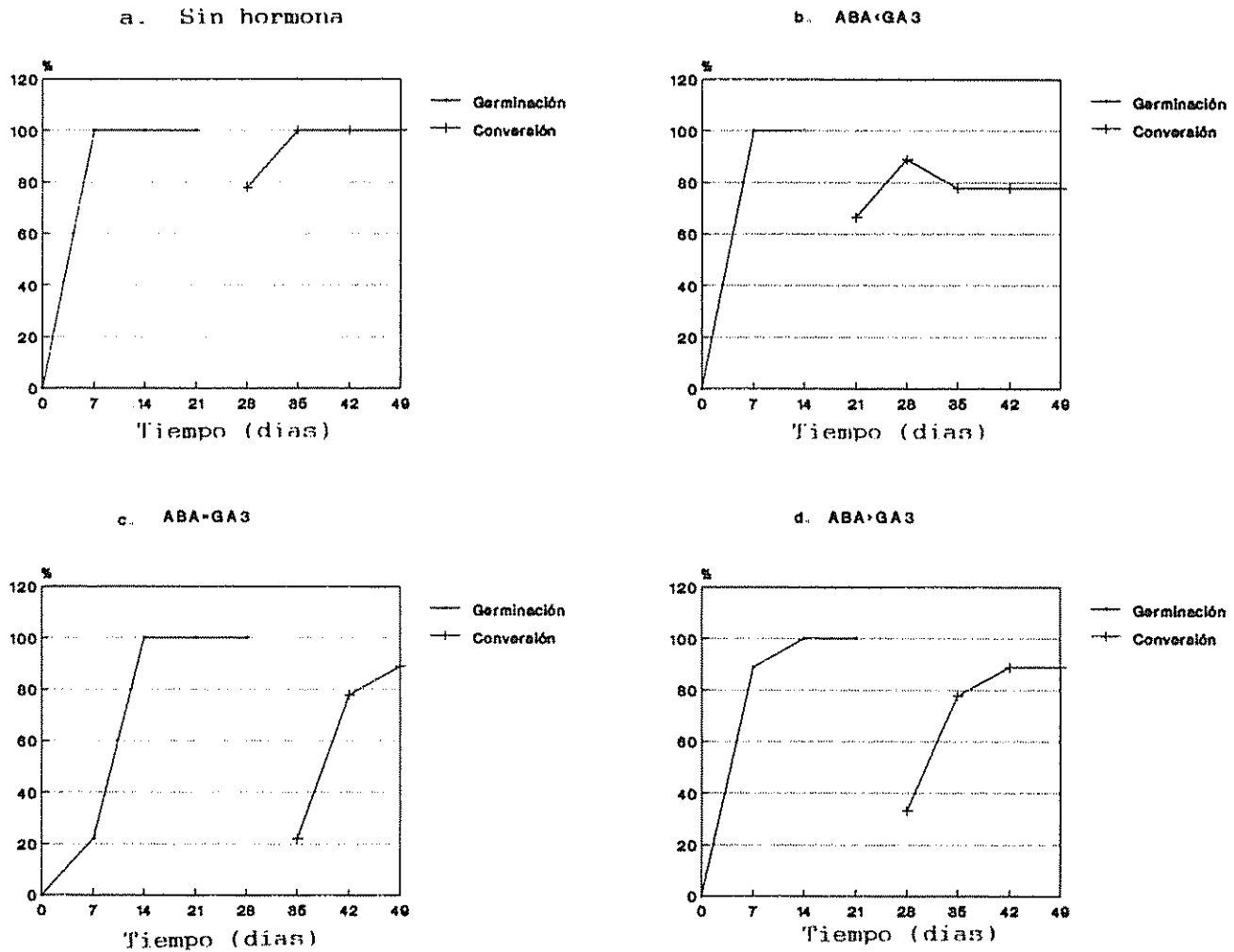


Fig. 1. Efecto de la sacarosa y la relación entre ácido abscísico y ácido giberélico.

En el tercer caso (Fig. 1c) se ratifica esta hipótesis teniendo en cuenta que se incrementaron las concentraciones de ABA en el medio, favoreciendo al ABA, en el balance endógeno, al menos en la acción reguladora, por lo que la germinación en este grupo de embriones no alcanzó el 100% hasta 15 días, lo cual se corrobora con el tratamiento ABA > AG3 que tuvo similar comportamiento en su dinámica de germinación.

Experimento 2.

Efecto de la sacarosa, el almidón y la relación AG3 - sustitutos del ABA

En la Fig. 2 se muestran solamente los resultados de los tratamientos que fueron suplementados con sacarosa 5% como fuente carbonada, puesto que los que contenían almidón de maíz al 1.5% no respondieron en ninguno de los tratamientos.

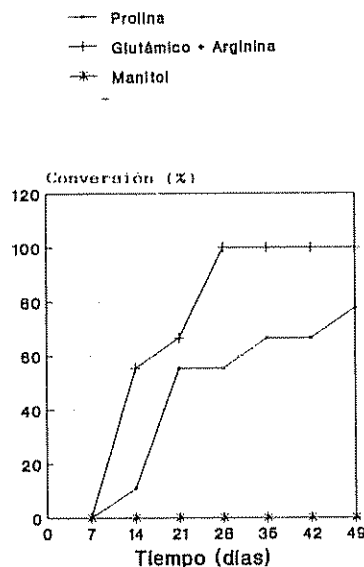


Fig. 2. Efectos de la sacarosa y los sustitutos del ABA.

La conversión se reduce al máximo con la presencia de manitol en el medio, sin embargo es favorecida por los aminoácidos, principalmente la combinación glutámico + arginina. Si se comparan los resultados de la Fig. 2 con los de la Fig. 1, se observa que estos aminoácidos aceleraron el proceso de conversión. Este comenzó a partir de los 14 días, mientras que en el experimento donde estuvo

presente el ABA, el mismo se inició a partir de los 21 días en el tratamiento ABA < AG3.

La arginina y el glutámico son los aminoácidos más abundantes en todas las fracciones proteicas de los cotiledones y están relacionados con los procesos de crecimiento y desarrollo, por sus funciones metabólicas y de reserva (García-Agustín y Primo-Millo 1990). Por otra parte, Kim y Janick (1991) lograron incrementos en la tolerancia de los embriones a la desecación, con aplicaciones adicionales de ABA y prolina en el medio. El reemplazo del ABA por el manitol fue tratado por Fujii *et al.* (1989) que señalan que el ABA sólo alcanza mayores tasas de conversión que al ser sustituido por el manitol o combinado con él.

Experimento 3.

Efecto de la fuente de almidón y su concentración

Los tipos de almidón probados, a concentraciones próximas a rangos determinados en los cotiledones, no constituyeron fuentes adecuadas para lograr los procesos de crecimiento y desarrollo, registrándose valores nulos en los tres casos para todas las concentraciones. Ello evidencia que ninguno de ellos fue capaz de ser movilizado para garantizar el suplemento equivalente a los aportes que alcanza la sacarosa en el medio en que fue empleado. Nuevamente los embriones colocados en el medio con el disacárido lograron los máximos porcentajes de germinación y conversión a plántulas.

Estudios precedentes demuestran que las tasas de germinación y conversión en medios enriquecidos con almidón sólo se aproximan a los de medios suplementados con maltosa, cuando los primeros son hidrolizados (Redenbaugh *et al.* 1987) lo que infiere la conveniencia de evaluar nuevamente almidón con estas características y continuar precisando los monosacáridos constituyentes del medio y los rangos de concentración óptimos para alcanzar la germinación y conversión de los embriones.

LITERATURA CITADA

- CAMPOS, A. 1986. Contribución al estudio de la poliembriónía de algunos géneros de Rutaceae. In Simposio Internacional sobre Citricultura. Memorias. v. 1, p. 57-59.

- CASTILLO, R. 1992. Semilla artificial presente y futuro. Cuba, ISACA
- FUJII, J. A.; SLADE, D.; REDENBAUGH, K. 1989. Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seeds. *Vitro Cell Development Biology* 25:1179-1182
- GARCÍA-AGUSTÍN, P.; PRIMO-MILLO, E. 1990. Changes in some nitrogenous components during the germination of citrus seeds. *Scientia Horticulturae* 43:69-817
- KIM, R.H.; JANICK, J. 1991. Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of celery somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 24:83-897
- KITTO, S. L.; JANICK, J. 1985b. Hardening increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110(2):283-286.
- LOVEY, B.R.; BRIEN, C.J.; KRIEDEMANN, P.E. 1975. Biosynthesis of abscisic acid under osmotic stress: Studies based on a dual labeling technique. *Physiologia Plantarum* 33:166-170.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D. 1969. Growth factors requirement of *Citrus* tissue cultures. In *International Citrus Symposium (1)*. Proceedings v. 3, p. 1155-1161
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-4977.
- REDENBAUGH, K.; SLADE, D.; VISS, P.; FUJII, J.A. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* 22(5):803-809
- WONG, J.R.; SUSSEX, I.M. 1980. Isolation of abscisic acid resistant variants from tobacco cell cultures. I. Physiological bases for selection. *Planta* 148:97-102.