



0038/
39

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFICIENCIA EN LA REGENERACIÓN DE EMBRIONES
SOMÁTICOS PRODUCIDOS A PARTIR DE CÉLULAS
CALLOGÉNICAS DE CITRICOS TRANSFORMADOS MEDIANTE**
Agrobacterium rhizogenes

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS (BIOLOGIA) PRESENTA

M en C. JOSE LUIS RODRIGUEZ DE LA O

MÉXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFICIENCIA EN LA REGENERACIÓN DE EMBRIONES
SOMÁTICOS PRODUCIDOS A PARTIR DE CÉLULAS
CALLOGÉNICAS DE CITRICOS TRANSFORMADOS MEDIANTE
Agrobacterium rhizogenes

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS (BIOLOGIA) PRESENTA

M en C. JOSE LUIS RODRIGUEZ DE LA O

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, como mi *alma mater* y al Departamento de Fitotecnia por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los apoyos recibidos durante mis estudios doctorales.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar mis estudios doctorales dentro de la Facultad de Ciencias.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por la dirección del presente trabajo, apoyo desinteresado y ejemplo de gran profesionalismo.

A la Dra. H. Susana Azpíroz Rivero y al Dr. Víctor M. Villalobos Arámbula por la asesoría brindada, apoyos y por su inquebrantable amistad.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch del Laboratorio de Biotecnología de la Univ. Aut. de Aguascalientes, por su valiosa colaboración en la consecución de la presente investigación y por su gran sentido de compañerismo.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo y Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón por su valiosos apoyos así como por amable colaboración y amistad brindada.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y Dr. Guillermo Laguna Hernández por sus aportaciones en la revisión del presente manuscrito

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por sus apoyos dentro del Laboratorio de Citología de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

A la M en C. Teresa Cervantes Martínez por su apoyo en el Laboratorio de Genética del Departamento de Fitotecnia de la UACH.

Al M en C. Alejandro Manzo González y al Ing. J. Antonio Urbano Hernández por sus apoyos y amistad brindada en todo momento.

A la TLQ. Martha Evelia Pérez Reyes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Aguascalientes por su valiosa colaboración y apoyos recibidos.

A Gisela García de la Rosa y Maribel Pacheco Sánchez, técnicos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Depto. de Fitotecnia de la UACH, por sus invaluable apoyos ofrecidos en la consecución del presente trabajo.

A la Biol. Rosa María Brito González del Laboratorio de Biotecnología del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo por sus valiosas sugerencias, consejos y apoyos recibidos desde el inicio de la presente investigación.

Finalmente: a todas aquellas personas (grandes amigos) e instituciones que participaron de una u otra forma directa o indirectamente y que se involucraron, brindándome el mejor de los ánimos para seguir adelante en todo momento muchas gracias!!

DEDICATORIA

A mis padres Emilia De LaO† y Agustín Rodríguez†: como pilares fundamentales en mi formación tanto moral como humana, con todo mi amor y gratitud...

A la Sra. Ma. De Lourdes Coronado Vda. de Gutiérrez (suegra): por su ejemplo de bondad y cariño que vierte en todo momento a todos los que la rodeamos...

A mi esposa Lupita por su invaluable paciencia, y apoyo en mi vida cotidiana y profesional

A mi hijo José Luis (Pepito), fuente de luz... que vino a enseñarme el verdadero valor y significado de la vida.

A mis hermanos: Graciela, Germán, Magdalena, Dulce María y Ma. Esther, por la unión que ha prevalecido aún bajo circunstancias adversas y que permanece con verdadero cariño y respeto

Canek habla a Guy:

_Mira el cielo; cuenta las
estrellas.

_No se pueden contar.

Canek volvió a decir:

_Mira la tierra; cuenta los granos
de arena.

_No se pueden contar.

Canek dijo entonces:

_ Aunque no se conozca, existe el
número de las estrellas y el número
de los granos de arena. Pero lo que existe
y no se puede contar y se siente aquí dentro, exige
una palabra para decirlo. Esta palabra, en este caso,
sería inmensidad.

Es como una palabra, húmeda de misterio. Con ella

No se necesita contar ni las estrellas
ni los granos de arena. Hemos cambiado
el conocimiento por la emoción:
que es también una manera
de penetrar en la verdad de las cosas

Ermilo Abreu Gómez

JURADO ASIGNADO:

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Víctor Manuel Villalobos Arámbula

Dra. Hilda Susana Azpíroz Rivero

Dr. Guillermo Laguna Hernández

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

CONTENIDO	Pagina
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
JURADO ASIGNADO	III
1. RESUMEN GENERAL	I
1.1 RESUMEN SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA	3
1.2 RESUMEN SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA	4
1.3 RESUMEN SOBRE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE <i>Citrus</i> MEDIANTE <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	6
1. GENERAL ABSTRACT	7
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 La embriogénesis somática	14
2.2 La transformación genética	16
3. OBJETIVOS E HIPOTESIS	19
3.1 Objetivo General	19
3.2 Objetivos específicos	19
3.3 Hipótesis general	20
3.4 Hipótesis específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Embriogénesis somática directa	22
4.2 Embriogénesis somática indirecta	26
4.2.1 Obtención de callos embriogénicos	26

4.2.2 Diferenciación y cuantificación de estructuras globulares o proembriones.	26
4.2.3 Influencia de la L-prolina y de la glutamina sobre la embriogénesis indirecta.	27
4.2.4 Cultivo de células en suspensión	28
4.2.5 Histología de callos embriogénicos	29
4.3 Transformación genética de callos embriogénicos	30
4.3.1 Medios y condiciones de cultivo	30
4.3.2 Características de la cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30
4.3.3 Protocolo de transformación	33
4.3.4 Prueba histoquímica de Gus	33
4.3.5 Cantidad de células transformadas	35

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1 Efecto del extracto de malta y disponibilidad de nitratos-amonio en la obtención <i>in vitro</i> de embriones somáticos en once genotipos de <i>Citrus</i> .	36
5.1.1 Influencia del extracto de malta (EM) y de las vitaminas en la obtención de embriones somáticos directamente del tejido nucelar	38
5.1.2 Relación nitratos- amonio	39
5.1.3 Germinación de embriones somáticos	42
5.2 Efecto de coadyuvantes de la embriogénesis en el desarrollo <i>in vitro</i> de estructuras embriogénicas en callos de <i>Citrus</i> .	49
5.2.1 Influencia de la L-prolina y de la glutamina en la formación de proembriones a partir de callos de <i>Citrus</i> .	53
5.2.2 Cultivo de células en suspensión	60
5.3 Transformación genética de callos embriogénicos de mandarina cv. "Monica" <i>Citrus sinensis</i> X <i>C. reticulata</i> mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .	63

5.3.1 Niveles de expresión del gen reportero Gus y crecimiento celular	73
6. DISCUSION GENERAL	76
7. CONCLUSIONES GENERALES	83
7.1 Conclusiones de la embriogénesis somática directa	85
7.2 Conclusiones de la embriogénesis somática indirecta	86
7.3 Conclusiones sobre la transformación genética de callos	87
8. REFERENCIAS	90
9. APENDICE	101

1. RESUMEN GENERAL

La regeneración de plantas completas a partir del cultivo de células y tejidos resulta un requerimiento indispensable para la aplicación y el aprovechamiento de diversas herramientas de tipo biotecnológico y sobre todo, aquellas que tienden a buscar el mejoramiento de las especies vegetales a partir de su transformación genética. Entre las diversas especies tropicales, los estudios sobre la regeneración *in vitro* de plantas ha sido muy importante, en *Citrus* se ha realizado a través de la organogénesis directa, promoviendo la obtención de plantas a partir de células y tejidos cultivados *in vitro* o al inducir la embriogénesis somática ya sea de manera directa o indirecta (formación de callo). Estas respuestas son frecuentemente observadas en diferentes tipos de explantes entre los que se incluyen tejidos nucelares, embrionarios, endospermicos, epicótilos, óvulos inmaduros y hasta lámina foliar. En los callos de tipo embriogénico aumentan en forma masiva los embriones cuando se emplean diferentes medios de cultivo, donde se incluyen las sales inorgánicas y destacan para estas respuestas los niveles de amonio y de nitratos, fuentes de carbohidratos, vitaminas y particularmente los coadyuvantes de la embriogénesis, como el extracto de malta, el glicerol y la galactosa, y también algunos reguladores del crecimiento como el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). Esto se ha venido explorando en diversos genotipos de *Citrus*, básicamente para la micropropagación, obtención de plantas

libres de patógenos y su manejo incluye el estudio de diferentes factores específicos. Actualmente la regeneración *in vitro* de plantas, es incluida en las estrategias de tipo biotecnológico que se están aplicando con las técnicas de transformación genética del ADN para el mejoramiento genético de las plantas, que incluye, en algunos casos, la incorporación de diversas fuentes genéticas de resistencia. A través de las técnicas del ADN recombinante o de la ingeniería genética, la transformación genética busca incluir la resistencia a virus y con diversas estrategias incorporar el gen de la proteína de la cápside (PC), este fenómeno de protección cruzada a nivel molecular está caracterizado por la capacidad que tiene de una raza suave viral para proteger a las plantas contra la infección de razas severas de un mismo virus. La resistencia mediante la incorporación del gen de la proteína de la cápside actúa como un mecanismo de protección cruzada contra virus que están relacionados o del cual que se derivó el gen de la PC. Esto se ha venido ensayando para diversas especies con algunos resultados muy prometedores. Con el objeto de llevar a cabo este tipo de investigaciones es indispensable al menos contar con sistemas apropiados que permitan garantizar el éxito de la transformación, primero uno que facilite de manera eficiente la inserción, la integración y la expresión de genes y segundo el contar con un protocolo de regeneración *in vitro* de plantas a partir de células y tejidos transformados. En la presente investigación se mantuvo como objetivo la evaluación de las respuestas de regeneración *in vitro* de diferentes cultivares de *Citrus* de acuerdo con su capacidad embriogénica, es decir la formación de embriones en forma directa y a partir de la formación de callos (indirecta) empleando como explante el tejido nucelar de semillas colectadas en diferentes

fechas después de haber llevado a cabo su floración, probando como estrategias de manejo *in vitro* diferentes medios de cultivo, constituyentes amonio-nitratos, coadyuvantes y reguladores del crecimiento. La investigación incluyó pruebas de transformación genética de callos nucelares, de mandarina cultivar Mónica *Citrus sinensis* X *C. reticulata*, caracterizados por su alta capacidad embriogénica, co-cultivados con una cepa de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, el objetivo básico fue evaluar en las células transformadas, la eficiencia de la expresión del gen Gus utilizando para su análisis histoquímico dos substratos 5-bromo-4-3indolil- β -D-glucuronido (x-glu-azul) y 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido (magenta); así como observar su crecimiento y estabilidad después de varios ciclos de selección con kanamicina.

1.1. RESUMEN SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA

La capacidad embriogénica de once cultivares de *citrus* fue evaluada empleando el tejido nucelar de semillas colectadas en diferentes fechas a partir de su floración. Las respuestas hacia los diversos constituyentes y medios de cultivo, de acuerdo con los porcentajes de embriones somáticos obtenidos, fue afectada por el genotipo, la edad de las semillas, la presencia coadyuvante del extracto de malta y la disponibilidad de las fuentes de nitratos y amonio.

El tejido nucelar de seis cultivares desarrolló respuestas embriogénicas en un medio de cultivo con las sales Murashige y Skoog (1962) MS al 100%, agregando 5 vitaminas, 500 mg/L de extracto de malta (EM) y adicionando 600 mg/L de nitrato

de sodio (NaNO_3), destacando así los genotipos de naturaleza poliembriónica como el cultivar "Chata" *C. sinensis* con 53% y la mandarina "Mónica" *C. sinensis* x *C. reticulata*, con 42 % de repuestas.

Cuatro cultivares produjeron embriones somáticos, cuando se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) con 500 mg/L de EM y disminuyendo hasta 200% los niveles de amonio y nitratos, el cultivar "Mónica" *C. sinensis* x *C. reticulata* destacó al lado de los otros cultivares presentando hasta 60% de respuestas hacia la formación de embriones. El tejido nucelar tomado de las semillas de toronjas *C. paradisi*, con una madurez de 22.2 semanas no presentó respuesta en los medios de cultivo y los constituyentes empleados.

Finalmente el medio con las sales MS con 0.1 mg/L de ácido indolacético (AIA), 0.1 mg/L de cinetina y 0.1 mg/L de ácido giberélico (AG_3) y otro con las sales MS y 500 mg/L de EM promovieron la germinación de embriones nucleares con un diámetro de 5 a 6 mm, en 6 semanas de cultivo.

1.2. RESUMEN SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA

Los coadyuvantes de la embriogénesis somática en *Citrus* como el EM y el glicerol promovieron la formación de estructuras embriogénicas a partir de callos nucleares del cultivar Jaffa *C. sinensis* hasta en 50% después de 6 semanas de cultivo, los callos fueron obtenidos en un medio con las sales MS, más 1.0 mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y en combinación con 0.1 mg/L de cinetina, después de 8 semanas.

La estrategia de incorporar los coadyuvantes y disminuir las fuentes de amonio y de 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 glutamina, los callos subcultivados del cultivar valencia tardía *C. sinensis* mostraron respuestas embriogénicas favorables en los tratamientos de 150 mg/L de prolina con la fuente de amonio disminuida al 75% y las sales de MS al 100% y también cuando disminuyeron al 50%.

Los tratamientos con las sales y con el amonio en los diferentes tratamientos con glutamina promovieron la formación de estructuras embriogénicas a partir de los callos de los cultivares "Parson brawn" *C. sinensis* L. Osbeck, "Jaffa" *C. sinensis* y "Valencia tardía" *C. sinensis* Osbeck .

En el cultivo de células en suspensión se destacaron las respuestas observadas en los callos del cultivar de naturaleza poliembriónica "Mónica" *C. sinensis* X *C. reticulata* después de 8 semanas, desarrollaron estructuras embriogénicas de tipo globular y embriones verdes en los medios líquidos donde se utilizaron las sales de MS y como coadyuvantes de la embriogénesis 46 g/L de galactosa y 28 ml/L de glicerol y 500 mg/L de extracto de malta. No hubo respuesta de células en los medios de cultivo donde se emplearon el ácido abscísico y la L-prolina.

1.3. RESUMEN SOBRE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE *Citrus* MEDIANTE *Agrobacterium rhizogenes*

Empleando medios de cultivo tanto en forma líquida como sólida, se exploró un sistema de transformación genética en callos embriogénicos de mandarina cv. "Mónica" *Citrus sinensis* x *C. reticulata* mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* las características de la cepa empleada es A4 tipo agropina que contiene un plásmido silvestre pRiA4 que lleva los genes rol y como vector binario el plásmido pESC 4 con el gen nptII que confiere resistencia a la kanamicina.

Para contabilizar las células fue necesario disgregar a los callos con gotas de citasa, observando con un microscopio óptico y un objetivo 100x, Los niveles alcanzados de transformación en los callos embriogénicos con la expresión histoquímica del gen Gus fue observada en células transformadas en 80% y 90% en dos substratos (x-glu) y (magenta-glucuro-CHA salt) ambos de Inalco pharmaceutical S. Luis Obispo. CA.

Entre 4 y 6 semanas después del cocultivo con *A. rhizogenes* los callos embriogénicos, en medios de cultivo sin la presencia de reguladores y conteniendo como coadyuvantes de la embriogénesis los niveles de 28 ml/L de glicerol y 46 g/L de galactosa las células transformadas mantuvieron su crecimiento en medios de selección con kanamicina (100 mg/L) y expresaron actividad hacia Gus, en forma estable.

Palabras clave: Susceptibilidad, infección, embriogénesis, poliembriónico, gen, dicotiledonea.

1. GENERAL ABSTRACT

The ability to regenerate complete plants from the cultivation in vitro of cell and tissue is an unavoidable requirement for the application of diverse biotechnological tools of biotechnologies mainly those used for the improvement of the crop species starting from their genetic transformation. Within of several tropical species the studies about in vitro regeneration has been very important. In Citrus, the studies on regeneration in vitro has been realized following the organogenesis, that promote the plant regeneration through the induction or the stimulation of cells and tissues cultivated in vitro through direct or indirect (calluses) induction of somatic embryogenesis these responses are frequently observed in explants among which are nucelar, embryonary and endospermatic tissues, epycotyls, ovules and even segments of leaf. The obtention of embryos in massive form increases with the use of embryogenic calluses, using several cultures medium containing inorganic salts, being outstanding the levels of nitrates and ammonium, type of carbohydrates, vitamins and particularly the use of coadyuvants of the embryogenesis and growth regulators for their induction. These responses have been explored both for the micropropagation, obtention of plants free of pathogens in diversas genotypes of citrus. The regeneration in vitro of plants actually ia a biotechnological strategy in to genetically improve the plants via the introduction of resistance to viruses and with diverse strategies to incorporate the gene of the protein capsida. This phenomenon of crossed protection at molecular level has been explored with some very promising results. To make research on this topic, its is necessary to have an appropriate system that guarantees the succes of the genetic transformation. There

must exist one which permits the efficient insert, integration, and expression of genes, and there must be a reliable protocol of regeneration in vitro of plants derived from transformed cells or tissues. In this research like objectives were to evaluate the responses of regeneration in vitro of several cultivars of citrus according to their embryogenic capacity, that is, in other words, the formation of embryos in direct form and starting from the formation of calluses (indirect form), using the nucellar tissue of seeds collected several weeks after having carried out their flowering and sowed in several mediums of culture and testing diverse strategies of handling in vitro studying the effects of different constituents, coadyuvants and growth regulators. This research includes tests of genetic transformation of nucellar embryogenic calluses of mandarin cultivar monica *Citrus sinensis* X *C. reticulata* mediated *Agrobacterium rhizogenes* cocultivated, considering first the preliminary stages for evaluating the efficient system of the histochemical expression of the reporter gene gus, using two substrates, x-glu, and magenta, and evaluated the growth of cells transformed in mediums of selection with kanamicin.

1.1. ABSTRACT OF EMBRYOGENESIS SOMATIC DIRECT

The embryogenic capacity of 11 cultivars of citrus was evaluated using the nucellar tissue isolated from seeds sampled several weeks after folwering. The responses to the different constituents and culture mediums according to the percentages of obtained somatic embryos was affected by the genotype characteristics, the age of the seeds, presence in the medium of extract malt coadyuvant and disponibility of

ammonium and nitrates. The nucellar tissue of six cultivars produced embryogenic responses in a medium with the MS at 100%, adding 5 vitamins, 500 mg/L of malt extract (EM), and adding to the levels of nitrates 600 mg.l⁻¹ of sodium nitrate (NaNO₃) the best responses were obtained in the cultivars of polyembryonic sources such as "Chata" *Citrus sinensis* with 53% of formation of embryos responses, and "monica" cultivars with 42% of the responses. four cultivars produced somatic embryos with the medium MS 500 mg.l⁻¹ of malt extract and diminishing 200% the percentage the levels of ammonium and nitrates in these conditions. The cultivar "monica" *Citrus sinensis* X *C. reticulata* produced 60% of the embryogenic responses in the cultivated nucellar tissues. Nucellar tissue of seeds with maturity of 22.2 weeks in grape fruits *C.paradisi*. did not show embryogenic responses. Finally, the medium with the MS salts adding 0.1 mg/L of giberellic ac.(GA₃), and other with MS salts and 500 mg/L of the malt extract promoted the germination of embryos selected with a diameter of 5-6 mm, cultivated during 6 weeks.

1.2. ABSTRACT OF EMBRYOGENESIS SOMATIC INDIRECT

The coadyuvants of somatic embryogenesis in citrus like malt extract and glycerol promoted 50% the responses in the formation of embryogenic structures in nucellar calluses from cultivar "jaffa" *Citrus sinensis* cultivated during 6 weeks in MS medium adding 0.1 mg/L of dichlorofenoxiacetic ac. (2,4-D) and combined with 0.1 mg/L of kinetin during 8 weeks. The strategy in vitro of the incorporation of coadyuvants and diminishing the sources of ammonium and nitrates in the medium

was assayed in the culture of calluses in different cultivars of citrus, combining treatments of aminoacid L-proline and glutamine. The subcultivated calluses of citrus of the orange valencia late cultivar showed favorable embryogenic responses to the medium with L-proline 150 mg/L and decreased of 75% and 50% the ammonium and nitrates levels. The treatments that involved glutamine promoted the formation of embryogenic structures in the "parson brown" *Citrus sinensis* and "jaffa" *C. sinensis* and orange "valencia late" cultivars when were incorporated the MS salts 100%, and 500 mg/L of malt extract in glutamine 200 mg/L. When the salt were diminished 50% only the cultivar "valencia late" promoted embryogenic structures of globular form. In the cell suspension culture the best embryogenic responses were observed when the calluses of poliembrionic source of the monica *Citrus sinensis* X *C. reticulata* cultivar were cultivated into salt MS medium containing galactose 46.g/L, glycerol 28 ml/L, and malt extract 500 mg/L. The calluses promoted de formation of green globular structures from callus cultivated during 8 weeks. The effects of abscisic ac. and L-proline in suspension cells culture produced poor embryogenic responses.

1.3. ABSTRACT OF *Agrobacterium rhizogenes* MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF EMBRYOGENIC CALLUSES IN CITRUS.

Using culture medium in liquid and solid form, the genetic transformation of embryogenic callus derived from the nucellar tissue in a cultivar of polyembryonic nature "monica" *Citrus sinensis* X *C. reticulata* was explored. The infection was made with *Agrobacterium rhizogenes* cocultivated using stump A4 agropine type containing a wild plasmid pRiA4 that carries the rol genes and as the binary vector the plasmid p ESC 4 with the gene nptII that confers resistance to kanamycin. To determine the number of transformed cells it was necessary to use a cytogenetic process to separate the calluses with drops of citasa, and to use a microscopic and 100x an ocular. The levels of transformation in the cells with the histochemical expression of the gus gene in the x-glu and magenta substrates were of 80% and 90%. After seven cycles of selection with kanamycin and four and six weeks cocultivated with *A. rhizogenes* the transformed cells in culture medium without growth regulators, but containing glycerol 28 ml/L and galactose 46 g/L maintained their growth in selection medium with 100 mg/L of kanamycin and expressed stable activity toward reporter gene gus.

Key words: Infection, embryogenesis, polyembryonics, gene, dicotyledon co-culture.

2. INTRODUCCIÓN

En el género *Citrus* uno de los mecanismos frecuentemente utilizado para la micropropagación de plantas, ha sido el de la embriogénesis somática, este sistema además de acelerar las tasas de multiplicación clonal, permite disponer de plantas libres de patógenos. Para la obtención de embriones somáticos *in vitro* se han empleado diversas fuentes de explante, como epicótilos, tejidos endospermicos, óvulos inmaduros, y tejido nucelar de semillas.

Diversos trabajos describen en *Citrus* la promoción de la embriogénesis *in vitro* evaluando la participación de diversos factores que van a permitir la inducción, el mantenimiento y la germinación de los embriones hasta lograr plantas completas. Para diversos genotipos se han valorado los tipos de explantes, la influencia de reguladores del crecimiento, la adición de coadyuvantes, las fuentes de carbohidratos, la fisiología de las plantas, así como otras condiciones físicas del medio de cultivo.

También se han venido ensayando en forma indirecta otros aspectos de la embriogénesis somática en *Citrus*, induciendo previamente la formación de embriones y la de callos en diversos explantes cultivados *in vitro*, estableciéndose que para algunos genotipos esta característica puede resultar muy efectiva para la proliferación de células con alta capacidad embriogénica, pero para otros, este tipo de respuestas pueden ser muy limitadas, por lo que en muchas ocasiones el manejo *in vitro* adquiere un papel muy relevante, incluyendo la presencia de distintos coadyuvantes y reguladores de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Por otra parte el manejo de células somáticas derivadas de callos ofrece

una excelente oportunidad para la regeneración masiva de plantas o mediante el aislamiento y la manipulación de protoplastos se obtienen nuevos híbridos y así se aprovecha desde el punto de vista del mejoramiento genético, la variación somaclonal que presente.

Actualmente el desarrollo biotecnológico en plantas permite la aplicación de diferentes métodos para su transformación genética. Existen técnicas que se emplean ya sea de manera directa o indirecta y sus resultados o aprovechamiento, se han asociado exitosamente con los esquemas de regeneración de plantas a partir de células y tejidos transformados, de tal manera que muchos de los principales esfuerzos se han dirigido a optimizar tanto la introducción como la expresión de la información genética incorporada. Se han establecido protocolos que permiten la regeneración de plantas transformadas, justificando particularmente el uso en un momento de las células embriogénicas como vehículo importante para facilitar la introducción de nueva información genética así como para la regeneración de plantas transformadas.

En la actualidad algunas técnicas usadas para el mejoramiento genético de los cítricos se han aprovechado para la exploración de diversas herramientas de tipo biotecnológico entre las que se han destacado, la propagación masiva de plantas *in vitro*, la regeneración de plantas libres de patógenos, la creación de nuevos híbridos somáticos *in vitro* a partir de la fusión somática de protoplastos, la manipulación de los niveles de ploidía mediante la obtención de nuevos materiales triploides originados de tejidos endospermicos y recientemente el mejoramiento genético mediante su transformación genética a través de las técnicas del ADN recombinante o de la ingeniería genética, con la posibilidad de incorporar nueva

información genética hacia el interior de su genoma. Aquí es donde la habilidad para regenerar plantas completas a partir del manejo *in vitro* de células y de tejidos transformados adquiere un papel relevante, ya que muchas veces se requieren los protocolos de regeneración *in vitro* y la caracterización de respuestas en materiales en forma anticipada a la aplicación de cualquier biotecnología que conlleve su modificación genética

2.1. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Maheshwari y Rangan-Swami en 1958 fueron los primeros en informar sobre la obtención de embriones somáticos en *Citrus* a partir del cultivo *in vitro* de óvulos. Actualmente la embriogénesis somática es una técnica que puede ser aplicada exitosamente, ya sea para conseguir en forma masiva plántulas idénticas y uniformes desde su punto de vista constitutivo (Nito e Iwamasa, 1990, Carimi *et al.*, 1994). Por otra parte este sistema resulta también una excelente alternativa para regenerar plantas libres de virus (De Pasquale *et al.*, 1994). La embriogénesis somática es un proceso que se ha venido mejorando, una vez que se han caracterizado diferentes cultivares con características poliembriónicas (Koltunow *et al.*, 1996). Algunos pretratamientos temporales sumergiendo diversos explantes y tejidos dentro de soluciones nutritivas han incrementado hasta en 60% la formación de embriones somáticos con características similares a los embriones de origen cigótico, este sistema de estímulo a tejidos presenta la limitante de impedir la acumulación suficiente de almidón en los embriones y tampoco define

meristemas de tipo caulinar y, aunado a la ausencia de proteínas de reserva, explica los bajos niveles de germinación (Cabasson *et al.*, 1997).

Existen diversos estudios que han destacado el potencial embriogénico de los callos derivados del cultivo *in vitro* del tejido nucelar, esto como un fenómeno natural o intrínseco de este tipo de tejidos en las plantas (Litz *et al.*, 1985). Hay datos que demuestran que sin la participación de reguladores del crecimiento los callos embriogénicos pueden ser mantenidos *in vitro* por aproximadamente 10 años (Kochba *et al.*, 1978). Por su parte Grosser y Gmitter (1990) y Gmitter *et al.* (1992), han reportado también cultivando óvulos inmaduros *in vitro* la obtención de callos con la capacidad para formar embriones en medios de cultivo durante muchos años sin el empleo de reguladores.

Existen muchos reportes acerca de la obtención de plantulas indirectamente del cultivo *in vitro* de callos (Kochba *et al.*, 1972), de células en suspensión (Hidaka y Omura 1989), de protoplastos (Grosser y Gmitter, 1990), así como a partir de células aisladas (Button y Botha 1975). Una cantidad elevada de embriones somáticos pueden ser producidos bajo sistemas de cultivo en suspensión, lo cual hace a esta técnica ideal para una micropropagación de plantas a gran escala de plantas sanas siendo posible trabajar incluso en forma automatizada (Cabasson *et al.*, 1997).

La embriogénesis somática ha sido observada en tasas altas también en medios de cultivo en forma sólida conteniendo galactosa (Cabasson *et al.*, 1995), aunque por otra parte, también se comenta, que el crecimiento continuo de células en medios de cultivo en forma líquida limita posteriormente el desarrollo de embriones.

Con relación a las características de los callos de tipo embriogénico, Gill *et al.* (1995), señalan que en la mandarina *Citrus reticulata* "Local sangtra" los mejores fueron los obtenidos a partir de segmentos del epicótilo, utilizando en el medio de cultivo las sales de MS con 10 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de cinetina, destacando la influencia de las vitaminas en la embriogenesis y reportaron hasta un 83% de respuesta en callos derivados del epicótilo. La limitante observada durante la germinación de embriones fue que de algunos solamente derivaron tallos y no formaron raíces.

2.2. LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

En la actualidad se reconoce que hay un énfasis particular para usar estos sistemas para su manipulación genética, utilizando a las células somáticas como vehículos receptores de nueva información genética que permita mejorar a los cultivares de *Citrus* existentes, de tal forma que se han venido realizando innumerables esfuerzos dirigidos al mejoramiento genético convencional con la ayuda y la aplicación de herramientas de tipo molecular y se ha destacado el hecho de contar con protocolos eficientes de regeneración *in vitro*. El uso del cultivo de callos embriogénicos como sistema de regeneración ha sido ensayado en especie de *Citrus* como: *C. grandis* (L) Osb. *C. aurantifolia* (Christm) Swingle. *C. medica* L., *C. sinensis* (L) Osb. *C. madurensis* L., *C. paradisi* Maef. *C. reticulata* Blanco y *C. limón*, demostrando que las diferentes respuestas dependieron del medio de cultivo y frecuentemente hacia los genotipos específicos (Gill *et al.*, 1994).

Los callos de origen nucelar de mandarina *Citrus deliciosa* Tan. formaron embriones cuando en el medio de cultivo se substituyó la sacarosa por la galactosa en una concentración de 0.15 M (Cabasson *et al.*, 1995). Otros estudios han ubicado a las fuentes de carbono, sorbitol y maltosa, como elementos indispensables para promover el desarrollo de embriones en zanahoria (Kinnersley y Henderson, 1988), sorbitol y manitol en *Vigna aconitifolia* (Kumar *et al.*, 1988), fructosa y galactosa en "musk melon" (Oridate y Yazawa, 1990), glicerol en *Citrus* (Ben-Hayyin y Neuman, 1983). Por su parte, Hidaka y Omura (1989), encontraron que la galactosa indujo la embriogénesis en varias especies de *Citrus* y que la sacarosa propició la formación de callos, destacándose el papel del glicerol como agente sincronizador de las respuestas embriogénicas durante el cultivo de células en *C. sinensis*, de tal manera que el cultivo de células es un sistema que aún se mantiene viable para el aislamiento de protoplastos (Kobayashi *et al.*, 1985), para la regeneración de plantas en forma masiva y últimamente para la transferencia de genes en forma directa (Hidaka *et al.*, 1990).

Aunque la transformación genética mediante el sistema *Agrobacterium*, ha sido establecido de manera eficiente para manipular muchas especies dicotiledoneas, en *Citrus*, la susceptibilidad ha sido descrita como menos efectiva. Moore *et al.* (1992) comentaron que la limitación de las respuestas de transfección es debida a la poca transferencia de ADN ya que en forma eficiente sólo reportaron del 4 al 8% de transformación en tallos inoculados y en manzano los niveles de eficiencia alcanzaron hasta 80% (Yao *et al.*, 1995).

Por lo anterior, se justifica explorar otros sistemas de transferencia de ADN ya sea en forma directa o indirecta en diferentes cultivares de *Citrus*. Los sistemas de

transformación con el uso de *Agrobacterium rhizogenes* se ha venido ensayando con éxito en la generación de raíces y plantas transgénicas del limón mexicano *Citrus aurantifolia*, expresando diferentes genes del virus de la tristeza de los cítricos (Pérez-Molphe-Balch y Ochoa, 1998).

Diversas técnicas de transformación usando la embriogénesis somática, buscan la producción de mayor número de plantas transformadas y menos de tipo quimérico, que pueden ser resultado del efecto de la transformación mediante el bombardeo de partículas en tejidos meristemáticos (Christou, 1990, Gambley *et al.*, 1993). Los cítricos comparados con otros frutales, pueden caracterizarse por responder a la embriogénesis somática *in vitro* en forma rutinaria, lo que puede ofrecer un sistema adecuado para favorecer la transformación genética de manera directa o indirecta y puede resultar una estrategia manipulando células o tejidos de materiales poliembriónicos derivados del tejido nucelar.

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en diferentes cultivares de *Citrus* su capacidad embriogénica directa observada en tejidos nucelares y en callos, después de haber llevado a cabo su transformación mediante *Agrobacterium rhizogenes*.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

A. Determinar el mejor medio de cultivo que permita inducir en los distintos cultivares la obtención de embriones somáticos, así como el que promueva su germinación hasta la regeneración de plantas completas

B. Evaluar el empleo de coadyuvantes de la embriogénesis somática *in vitro* así como el empleo de reguladores del crecimiento, en medios de cultivo tanto de tipo líquido como sólido.

C. Caracterizar el cultivar de *Citrus* con la respuesta embriogénica óptima tanto en forma directa a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar, como de manera indirecta en callos.

4. MATERIALES Y METODOS

A continuación se presentan las metodologías que se emplearon de acuerdo con la secuencia en que se realizaron los diferentes experimentos, para cada una de las etapas contempladas en la presente investigación.

4.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA

Los experimentos para evaluar desde las respuestas en la inducción de la embriogénesis somática hasta la germinación de embriones se realizaron en forma directa a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar en frutos de once genotipos de *Citrus* colectados en el poblado de Cazones, Veracruz, México, en diferentes semanas después de haber llevado a cabo su floración (SDF). Los cultivares fueron los siguientes: "Valencia tardía" (*Citrus sinensis*) (17.2 SDF), Naranja "Valencia Temprana" (*C. sinensis*) (15.6 SDF), Mandarina "Mónica" (*C. sinensis* x *C. reticulata*) (15.6 SDF) "Reyna" (*C. reticulata*) (15.6 SDF), Tangelo "Mineola" (*C. paradisi* x *C. reticulata*) (15.6 SDF), "Chata"(*C. sinensis*) (17.2 SDF), "Tangerina" (*C. reticulata*) (15.6) "Naranja agria" (*C. aurantium*) (13.0 SDF), "Toronja blanca" (*C. paradisi*) (22.2 SDF), "Toronja rosada" (*C. paradisi*) (22.2 SDF), "Toronja doble roja" (*C. Paradisi*) (22.2 SDF).

Los frutos de los diversos cultivares de *Citrus* fueron colocados en recipientes para ser lavados con agua y detergente, en cada genotipo se procedió a abrir los frutos con navaja para aislar las semillas sin dañarlas, posteriormente, se pusieron en agitación durante 20 minutos en 500 ml de agua con detergente (agregando gotas

del surfactante Tween 20) y se depositaron en alcohol diluido al 15 % durante 3 minutos, se enjuagaron con agua estéril, se les dio un tratamiento con hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 3% durante 15 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Después se colocaron en cajas de Petri y con ayuda de pinzas y bisturíes con navajas del No. 11, se procedió a eliminar las cubiertas de las semillas observándose con un microscopio estereoscópico Wild TYP 308700 Heerbugg, Switzerland. Lente Plan 1 X y 10 x 121. Ya expuestos los cotiledones y tomando en cuenta la región embrionaria, fueron separados los embriones de origen cigótico, dejando para su cultivo a los tejidos nucelares y a los cotiledones, tomando en cuenta al sembrarlos *in vitro* la posición de la calaza y del micrópilo como lo sugieren Navarro *et al.* (1984).

En los medios de cultivo se emplearon como base las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementándolas con 3% de sacarosa, 100 mg/L de mio-inositol, solidificándolos al incorporar 10 g de bacto agar, ajustando el pH a 5.7 ± 0.1 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1 N. Los experimentos se realizaron con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el día y $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la noche con intensidad lumínica de 1700 a 2100 grados lux con lámparas de luz fluorescente "flurotest SLIMLINE" de 75W. Cabe mencionar que de los once materiales de *Citrus* utilizados varios son de naturaleza poliembriónica, como es el caso de la mandarina "Mónica" que se originó de la cruce de dos genotipos poliembriónicos *Citrus sinensis* con *C. reticulata*. Otros genotipos como algunas toronjas *C. paradisi*, tuvieron escasez de

semillas en los frutos colectados, característica que limitó su manejo estadístico y para sus respuestas se calcularon los porcentajes para las diferentes variables: contaminación, oxidación, formación de embriones, presencia de callos, tejidos con respuesta y en algunos casos la germinación. La evaluación se efectuó después de doce semanas de cultivo *in vitro*.

Cuadro 1. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN FORMA DIRECTA A PARTIR DEL CULTIVO *in vitro* DE TEJIDO NUCELAR.

Medio	Fuentes de Nitrógeno mg/L	Suplementos mg/L
N	Las de MS al 100%	tiamina HCL 0.2, piridoxina HCL 1.0, Acido nicotínico 1.0, glicina 4.0, mio-inositol 100, extracto de malta 500. Sacarosa 5%
R	NH ₄ NO ₃ 1650 KNO ₃ 1900 Ca (NO ₃) ₂ 1000 Na NO ₃ 600	tiamina HCL 0.2, piridoxina HCL 1.0, Acido nicotínico 1.0 glicina 4.0, mio-inositol 100, extracto de malta 500.
A	NH ₄ NO ₃ 0.8 (10µM) KNO ₃ 0.5 (5 µM) Ca (NO ₃) ₂ 0.4 (3 µM)	tiamina. HCL 0.2, piridoxina HCL 1.0, Acido nicotínico 1.0, glicina 4.0, mio-inositol 100, extracto de malta 500.
C	Las de MS al 100%	Sin suplementos

4.1.1. Germinación *in vitro* de embriones somáticos

Los embriones somáticos obtenidos de diferentes genotipos de *Citrus*, se aislaron y separaron en tres grupos, de acuerdo con su diámetro para determinar el estado óptimo en que llevan a cabo su germinación. El primer grupo, que incluyó embriones menores o iguales a 1 mm de diámetro, el segundo grupo constituido por embriones de 2 a 3 mm y el tercero por embriones de 5 a 6 mm, que fueron sembrados en cuatro medios de cultivo sólidos (Cuadro 2), colocando en promedio entre 30 y 40 en cada medio con 20 repeticiones. La evaluación se efectuó a las 6 semanas después de haber iniciado su cultivo *in vitro*.

CUADRO 2. MEDIOS DE CULTIVO USADOS PARA LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE 11 CULTIVARES DE *Citrus*.

Medio	MS (%)	Suplementos mg/L	Reguladores mg/L	
G1	100	tiamina- HCL	100	
		mio-inositol	100	
		caseína hidrolizada		
		sacarosa	3%	
G2	100	tiamina- HCL	0.4	
		mio-inositol	100	
		caseína hidrolizada	400	
		sacarosa	3%	
G3	50	Sin suplementos	benciladenina	5.0
G4	100	sacarosa	3%	
		tiamina- HCL	0.4	
		mio-inositol	100	
		caseína hidrolizada	400	
		extracto de malta	500	
sacarosa	3%			

4.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA

4.2.1 Obtención de callos embriogénicos

Se utilizaron semillas de 5 materiales de *Citrus* con edades entre 8 y 11 semanas después de la polinización de los cultivares Naranja "Parson brown" *Citrus sinensis*, Naranja "Jaffa" *C. sinensis*, mandarina "Cleopatra" *C. sinensis* reshni Tan, "Valencia tardía", *C. sinensis* y Mandarina "Rangpure" *C. limonia*, provenientes del campo experimental de General Teherán, Nuevo León, México.

Las semillas exponiendo el tejido nucelar fueron sembradas *in vitro* y derivaron callos en un medio básico MS (1962), suplementado con 3% de sacarosa, 0.4 mg/L de tiamina-HCL, 100 mg/L mio-inositol y 500 mg/L de extracto de malta, utilizando dos tratamientos con 1.0 mg/L de 2,4-D y combinando 0.1 mg/L de cinetina más 1.0 mg/L de 2,4-D. La incubación fue bajo una intensidad luminosa de 3000 lux, con lámparas de luz fluorescente SLIMLINE de 75W, con (26° C) 16 horas luz y (24° C) 8 horas de oscuridad.

4.2.2 Diferenciación y cuantificación de estructuras globulares o proembriones

Con el propósito de inducir la formación de embriones somáticos de manera indirecta en los callos, se utilizaron las semillas que en los medios de cultivo con 2,4-D y cinetina, produjeron callos y estos posteriormente fueron transferidos a un medio con las sales MS con vitaminas, 3% de sacarosa, 10 ml/L de glicerol y 500 mg/L de extracto de malta. La diferenciación de estructuras globulares, o

proembriones, fue cuantificada utilizando un microscopio estereoscópico WILD TYP 308700 Heembrugg, Switzerland con un lente Plan lx y 10x/21, asignándoles un porcentaje de valor observable de acuerdo con su frecuencia en los callos.

4.2.3 Influencia de L-prolina y de glutamina sobre la embriogénesis indirecta

La diferenciación de estructura embriogénicas o proembriogénicas a partir de callos embriogénicos de los cinco materiales de *Citrus*, se observaron en los callos que se subcultivaron en los medios siguientes:

A. 100% de las sales inorgánicas de MS (1962), disminuyendo únicamente el 75% la fuente de amonio (NH_4) y utilizando como tratamientos de L-prolina 0.0, 150, 250, 350 mg/L

B. Disminuyendo las sales de MS al 50% con los tratamientos de L-prolina 0.0, 150, 250, 350 mg/L.

C. Las sales de MS (1962) al 100%, disminuyendo el 75% la fuente de amonio y empleando como tratamiento de glutamina 0.0, 200, 400, 600 mg/L.

D. Las sales de MS diluidas al 50% con los tratamientos de glutamina 0.0, 200, 400, 600 mg/L.

Los suplementos utilizados en los cuatro medios de cultivo, fueron 5% de

sacarosa, 10 mg/L de tiamina -HCL, 100 mg/L de mio-inositol, 5.0 mg/L de ac. nicotínico, 10 mg/L de pridoxina, 10 mg/L de piridoxina , 10 mg/L de glicina, 500 mg/L de extracto de malta y 10 mg/L de glicerol, ajustándolo a un pH de 5.6 ± 0.1 con NaOH y HCL-IN y gelificándolo con Difco Bacto Agar al 0.8%.

En todos los experimentos se hicieron 20 repeticiones por tratamiento y como variables las frecuencias observables sobre necrosamiento (oxidación) de callos, la formación de estructuras proembrionarias de tipo glubular y de embriones. Para el análisis estadístico se empleó el programa MSTAT-P, Michigan State University "Statistical Package" y como modelo bloques completamente al azar "Three Randomised complete Block Design".

4.2.4 Cultivo de células en suspensión

Para inducir la formación de embriones a partir del cultivo de células en forma líquida, se tomaron callos con un peso fresco aproximado de 600 mg de diferentes materiales de *Citrus*, colocándolos para su disgregación en tres medios de cultivo líquido elaborados con distintos constituyentes y distribuidos en frascos de tipo Gerber, se colocaron en un equipo LAB-LINE Shaker Melrose Park ILL. No. 03590 Orbit empleando una velocidad de agitación de 80 rpm.

4.2.4.1 Medio S₁ : conteniendo las sales del medio de Nisch (N-1969) sin reguladores y suplementado con 100 mg/L de mio-inositol, 100 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L piridoxina-HCL, 0.5 mg/L de tiamina-HCL, 2.0 mg/L de glicina,

0.5 ácido fólico, 0.05% de biotina, probando el efecto de 12 μM de prolina, 50 μM , de ácido abscísico (ABA), 6% de sacarosa y 1.0 mg/L de 2,4-D.

4.2.4.2 Medio S₂: Constituido con las sales de MS (1962), agregándoles 46 g/L de galactosa, 30 μM , de ácido giberélico y 500 mg/L de extracto de malta.

4.2.4.3 Medio S₃ : Utilizando las sales de MS al 100% adicionándoles 30 mg/L de glicerol, 30 μM de ácido giberélico (AG₃) y empleando 500 mg/L de extracto de malta.

Los cultivos en suspensión se mantuvieron por 16 horas a intensidad lumínica de 1000 lux y 8 horas de oscuridad, con una temperatura constante de incubación de 24° C. Las variables a cuantificar fueron color de callos y formación de estructuras globulares, embriones completos, porcentajes de contaminación y de oxidación por cada medio de cultivo empleado y cultivar.

4.2.5 Histología

En los cortes de callos embriogénicos de *Citrus*, se realizó una tinción combinada de safranina al 1% durante 30 minutos y verde rápido, 2 minutos, y solución alcohólica al 50%.

4.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS

4.3.1 Medios y condiciones de cultivo

El tejido nucelar tomado de semillas de la mandarina cv. "Mónica" *Citrus sinensis* x *C. reticulata* con 15 semanas después de su floración, formó callos embriogénicos cuando se cultivaron en medios de cultivo conteniendo las sales inorgánicas de MS, al 100%, 0.1 mg/L de cinetina, 0.1 mg/L de ácido giberélico (AG₃) y 500 mg/L de extracto de malta.

Los callos nucleares caracterizados por una elevada capacidad embriogénica fueron ubicados, cuando se subcultivaron, en medios de cultivo conteniendo las sales inorgánicas de MS, sin la adición de reguladores del crecimiento y substituyendo a la sacarosa (3%), por diferentes niveles de galactosa 1.4, 14.0, 28.0, 46.0 g/L y de glicerol 1.4, 14.0, 28.0, y 46.0 g/L.

Este tipo de respuestas fue experimentada previamente tanto en medios líquidos como en sólidos, en la etapa de esta investigación cuando se indujo la formación de callos en los cultivares de *Citrus* a partir de tejido nucelar y donde se observó la influencia determinante en la obtención de embriones de estos dos coadyuvantes.

4.3.2 Características de la cepa de *Agrobacterium rhizogenes*.

Para la transformación de los callos embriogénicos, se utilizó el cocultivo con la bacteria *A.rhizogenes* cepa A4 tipo Agropina, que contiene el plásmido silvestre pRiA4 que confiere el genotipo de raíces pilosas(Figura 1). En adición, esta cepa

lleva el plásmido pESC4, con los genes *rol*, que hacen a los tejidos más sensibles a los reguladores del crecimiento (Figura 2). Además actúa como vector binario, llevando el gen *nptII* que da resistencia a kanamicina, y el gen **Gus**. Este último está bajo control del promotor **cab**, es inducible por luz y en menor medida por citocininas. Este plásmido fue construido por los Drs. June Simpson y Luis Herrera Estrella en el CINVESTAV Irapuato-IPN. El promotor **cab**, normalmente sólo se expresa en tejidos verdes por lo que en teoría, las pruebas histoquímicas no podrían facilitar la expresión del gen GUS en los callos infectados, aún cuando estuvieran transformados, por lo que una estrategia para evaluar la eficiencia de la transformación fue aumentar los niveles de citocininas.

Este plásmido fue introducido en la bacteria mediante electroporación de acuerdo con el método de Singh et al. (1992). La cepa se mantuvo bajo subcultivo durante 60 días en el medio YM sólido (Hooykaas et al., 1977), adicionando 50 mg/L de rifampicina y 50 mg/L de kanamicina.

Este medio está constituido por manitol 10 g/L, sulfato de magnesio 2 g/L, fosfato dibásico de potasio 0.5 g/L, extracto de levadura 0.4 g/L, cloruro de sodio 0.1 g/L y agar 12 g/L. Para obtener las suspensiones bacterianas para el cocultivo, se inoculó una colonia en medio YM líquido con los mismos antibióticos y se incubó por 72 h a temperatura ambiente con agitación orbital 120 (rpm).

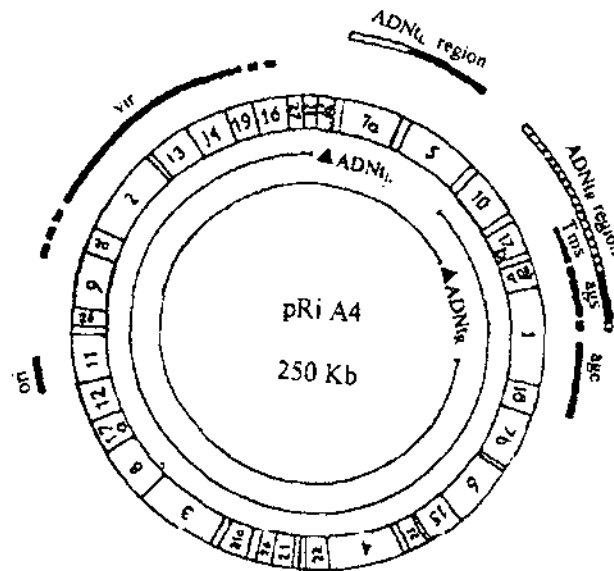


Figura 1 Plásmido silvestre pRiA4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Los genes *rol* se encuentran en el ADN*ti*.

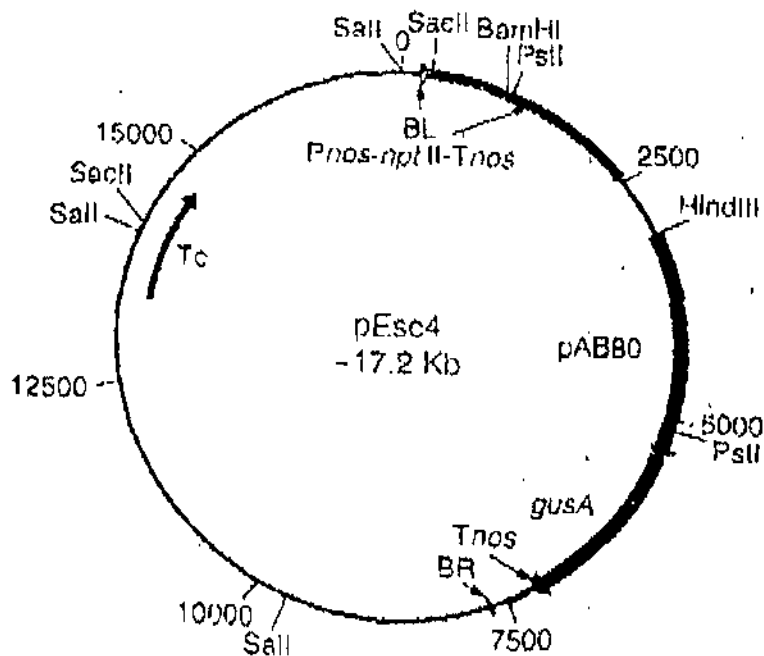


Figura 2. Plásmido pESC4 (Tomado de Jofre-Garfias *et al.*, 1997)

4.3.3 Protocolo de transformación.

Se tomó una colonia de la bacteria y se inoculó en el medio YM líquido con 50 mg/L de rifampicina y 50 mg/L de kanamicina. Se incubaron en agitación de 100 a 120 rpm, a 28^oC por 48 a 72 horas (o hasta obtener una buena densidad bacteriana). Las bacterias se diluyen 1:10 con medio MS líquido adicionado con 100 μ M de acetosirigona. El tejido que se va a transformar se coloca en un frasco con la suspensión bacteriana al menos 45 minutos. Durante este tiempo se aplica vacío por 30 segundos (para facilitar la penetración de la bacteria). El tejido impregnado con la bacteria se coloca en medio sólido (el medio depende de la etapa de diferenciación del tejido), sin antibióticos. Se le da un tiempo de cocultivo de 72 a 96 horas. Una vez terminado este, el tejido se transfiere a un medio con 300 mg/L de claflozan, 300 mg/L carbencilina y 80 mg/L de kanamicina. Los dos primeros antibióticos matan a la bacteria y el tercero se utiliza para seleccionar a las células transformadas.

4.3.4 Prueba histoquímica de **GUS**.

Para las pruebas de expresión histoquímica para la β -Glucuronidasa se emplearon se emplearon como soluciones de reacción (Cuadro 3) y como sustratos tanto el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido (x-glu) para detectar la expresión del gen reportero **Gus** que es frecuentemente el más usado en el desarrollo de plantas transgénicas, esta técnica fue descrita por Jefferson et al., (1987) y sustrato 5-

bromo-6-cloro-3indolil- β -D-glucuronido (Magenta-glucuro-CHA salt) ambos substratos de Inalco Pharmaceutical 670 Marsh Street S. Luis Obispo CA.

CUADRO 3. ENSAYO HISTOQUIMICO PARA LA β -GLUCURONIDASA (GUS)

SOLUCION DE REACCIÓN:

Amortiguador de fosfatos 1M	100 μ L	100 mM
EDTA 0.25 M	40 μ L	10 mM
Ferrocianuro de potasio 5 mM	100 μ L	0.5 mM
Triton 10%	10 μ L	0.1%
X-glucuronidasa 40 mM	50 μ L	2.0 mM
Agua destilada	600 μ L	
Total	1000 μ L	

Cubrir el tejido e incubar 37° C hasta que aparezca el precipitado azul

CUADRO 4. PREPARACIÓN DE AMORTIGUADOR DE FOSFATOS.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 1M	
Fosfato monobásico de Na	12.0 g/ 100 ml
Fosfato dibásico de Na	14.2 g/ 100 ml
Añadir el primero al segundo hasta alcanzar un pH de 7 EDTA 0.25 M	
0.465 g/50 ml de amortiguador fosfatos 100 mM pH 7 Ferrocianuro de potasio 5 mM	
82.5 mg/50 ml de amortiguador fosfatos 100 mM pH 7 X- glucuronidasa 40 mM.	
5.2 mg/ 250 μ l de dimetilformamida	

Las pruebas de transformación se realizaron en los callos provenientes tanto de medios de cultivo en forma sólida como líquida, aplicando las soluciones bacterianas en los callos usando pipetas de 200 μ l, manteniéndose la infección, bajo cocultivo durante 8 semanas en la solución de x-glu y magenta sometiéndose a una temperatura de 20 a 25°C en la oscuridad durante 12 horas.

4.3.5 Cantidad de células transformadas

Con el propósito de buscar la disgregación de los callos y obtener la uniformidad visible de células transformadas, se empleó un procedimiento descrito por Fabergé (1945), quién recomienda un complejo de enzimas o citasa como medio para la maceración de tejidos vegetales y en ambos casos las células son fácilmente separadas, el complejo enzimático se obtiene fácilmente del estómago del caracol de jardín (*Helix spp*). Los callos cocultivados con la bacteria *A. rhizogenes* provenientes de los medios de cultivo sólidos y líquidos, en los diferentes tratamientos de regeneración embriogénica fueron puestos en cajas de Petri con papel humedecido y en un portaobjetos se les colocó una o dos gotas de citasa dejándolos durante 15 minutos, posteriormente se inició su observación aplicándoles el cubreobjetos y con la ayuda de un microscopio Polyvar American Optical, utilizando como objetivos 100x X 10 X 1.25 = (1250) aumentos, se tomaron como datos numéricos el total de células, el porcentaje de transformadas (teñidas), su promedio y su desviación estándar considerando cinco campos oculares del microscopio y veinte repeticiones por tratamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EFECTO DEL EXTRACTO DE MALTA Y DISPONIBILIDAD DE NITRATOS - AMONIO EN LA OBTENCIÓN *In vitro* DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN ONCE GENOTIPOS DE *Citrus*

Actualmente diversos autores han mostrado un especial interés en el estudio de los factores que controlan la capacidad de células y tejidos para regenerar plantas *in vitro*, como requerimiento previo a la aplicación de cualquier técnica biotecnológica. En el mejoramiento genético del género *Citrus*, se han venido explorando diversas técnicas de tipo biotecnológico entre las que destacan las del ADN recombinante o ingeniería genética, básicamente para la obtención de plantas resistentes a virus (Moore *et al.*, 1992). Uno de los mecanismos más estudiados para la obtención y la multiplicación de plantas *Citrus* ha sido la embriogénesis somática directa o indirectamente a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar de diferentes cultivares, en donde se ha considerado el efecto de diferentes factores que promueven la inducción, el mantenimiento y la germinación *in vitro* de embriones somáticos, hasta obtener plantas completas (Wann 1988).

En los estudios recientes sobre la embriogénesis en *Citrus* se han experimentado diferentes aspectos incluyendo histología, herencia, variación, fisiología y bioquímica y hasta ahora los resultados indican que la regulación génica del desarrollo de

embriones nucelares *in vitro* es la clave para resolver los mecanismos de la embriogénesis *in vitro* y que diferentes cultivares pueden tener variación en aspecto aunado a las condiciones de su manejo experimental, por ello se pueden encontrar varias respuestas con base en el estudio de la expresión de genes que controlan la poliembrionía en diferentes cultivares (Zheng y Chen, 1994).

Otras evidencias demuestran que las células en este tipo de tejidos, pueden encontrarse en un estado predeterminado o proembriogénico, por ello para formar embriones se requiere poca o nula participación de reguladores de crecimiento en forma exógena, en ocasiones la participación de estos en los medios de cultivo, limitan las respuestas *in vitro* (Sim *et al.*, 1988). Las investigaciones sobre la embriogénesis somática en *Citrus* han demostrado que las respuestas son influenciadas por el genotipo y la participación de coadyuvantes en el medio de cultivo como el extracto de malta y la caseína hidrolizada (Parthasarathy y Nagaraju, 1994).

Además de la embriogénesis, el mantenimiento, la madurez y el tamaño de los embriones somáticos desarrollados *in vitro*, son aspectos importantes que influyen en la germinación hasta obtener plantas completas. El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental evaluar las respuestas embriogénicas de diferentes genotipos de *Citrus*, con el propósito de identificar las mejores y así presentar un sistema de regeneración directa de embriones a partir del tejido nucelar.

5.1.1 Influencia del extracto de malta (EM) y de las vitaminas en la obtención de embriones somáticos directamente del tejido nucelar

La producción de embriones somáticos de tejidos nucelar de los genotipos de *Citrus* fue prácticamente nula en el medio C (cuadro 1), que incluyó únicamente las sales del medio MS sin suplementos vitamínicos, coadyuvantes o fuentes de carbono. La adición de 500 mg/L del extracto de malta a las sales del medio MS, suplementadas con vitaminas y sin la adición de reguladores de crecimiento medio N (cuadro 1), produjo hasta 50% de respuesta en la obtención de embriones a partir del tejido nucelar cultivado *in vitro* en el cultivar "Mónica" (*Citrus sinensis* x *C. reticulata*) colectado 15.6 semanas después de su floración. Por otra parte, con este mismo medio, la producción *in vitro* de embriones somáticos se observó en 10% en los cultivares Naranja "Valencia" temprana (*C. sinensis*) con 15.6 SDF, "Reyna" (*C. reticulata*), 15.6 SDF y "Toronja doble roja" (*C. paradisi*) de 22.2 SDF. Los porcentajes de respuesta logrados con la adición del extracto de malta (figura 1) también han sido obtenidos por diversos autores, quienes en *Citrus* la ubican como uno de los mejores coadyuvantes de embriogénesis somática, evitando el empleo de reguladores de crecimiento (Kobayashi *et al.*, 1984; Spiegel-Roy y Vardi, 1984; Moore, 1985)

5.1.2 Relación nitratos - amonio

La mayor cantidad de cultivares de *Citrus* formaron embriones somáticos en el medio R, que incluye las sales inorgánicas de MS con suplementos, vitaminas y con varios niveles de nitratos (cuadro 1), destacando "Chata" (*C. sinensis*) que produjo 53% de embriones en los tejidos nucelares sembrados, el cultivar "Mónica" presentó en 42% de los tejidos sembrados, mientras que aproximadamente 20% en los cultivares "Reyna", "Chata" y "Valencia tardía" formaron embriones, respuesta y que disminuyó el 10% en el cultivar "Valencia temprana", cuando decrecieron los niveles de nitratos y de amonio hasta en 200 %. Con las sales inorgánicas de MS medio A, las respuestas para la obtención de embriones se observó en cuatro cultivares destacando la mandarina "Mónica" de naturaleza poliembriónica con una respuesta de hasta 60%, seguida por el cultivar "Reyna" 20% y los cultivares "Valencia Tardía" y "Chata", que tuvieron sólo 10% de respuestas (Fig. 3).

La formación de embriones en *Citrus*, frecuentemente se observa a partir de las células de tejidos nucelares, ligadas al área micropilar al final del saco embrionario. Muchas veces las semillas bajo cultivo *in vitro* exponiendo a los tejidos nucelares permiten que se obtengan embriones somáticos de origen nucelar, cuando endógenamente se le suministran los nutrientes del endospermo o bien exógenamente, balanceando los suministros que les permitan su inducción y desarrollo, tanto la obtención como el cultivo de embriones somáticos, puede ser utilizado para la propagación clonal de diversas especies vegetales.

Los porcentajes obtenidos en la embriogénesis somática en los cultivares de citrus, estuvo fuertemente influenciada por la presencia del extracto de malta como coadyuvante, pero sobre todo por la disponibilidad de amonio y nitratos en el medio de cultivo, en las semillas al momento de su siembra, lo anterior coincide con investigaciones, en donde se reporta que para algunos cultivares la embriogénesis se incrementa cuando disminuyen sustancialmente los niveles de estos constituyentes (Nel, 1987; Song *et al.*, 1991), aunque existen otros estudios que han demostrado que la disponibilidad adecuada de amonio (NH_4), y nitratos (NO_3) entre los constituyentes básicos del medio de cultivo, tienen mucha influencia para promover las respuestas embriogénicas, de hecho para ciertos cultivares de *Citrus*, resulta muy importante precisar esta relación (Niedz, 1994).

La embriogénesis somática a partir del cultivo de tejidos nucelar fue prácticamente nula en los cultivares de "Naranja Agria" con 13 semanas después de su floración y en los cultivares de toronja, con una madurez de la semilla de 22.2 semanas, por lo que se comprueba lo señalado por Grosser (1994) y Gmitter *et al.* (1990) quienes comentan que semillas con períodos mayores a los 16 y 18 semanas después de su floración, no resultan óptimas para inducir la embriogénesis somática *in vitro*. Lo anterior se observa en la figura 3, ya que las mejores respuestas se lograron en los genotipos cuya madurez osciló entre 14 y 15 semanas después de su floración.

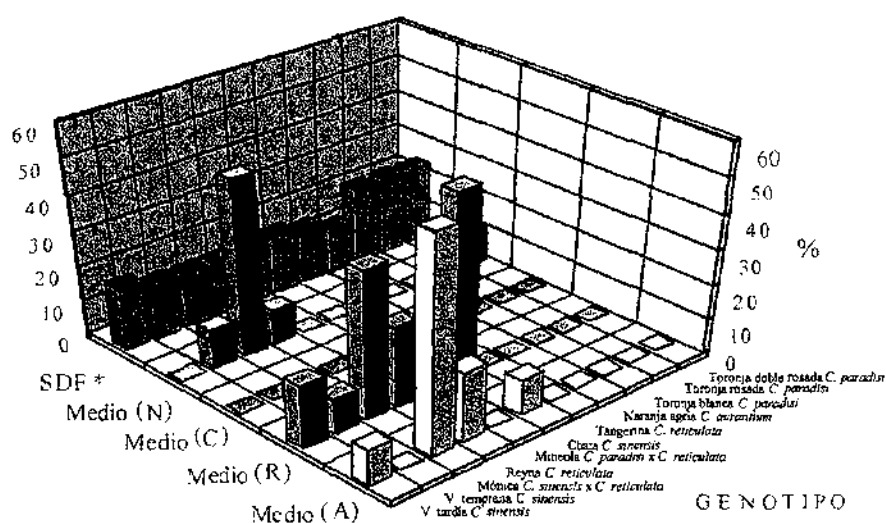


Figura 3. Porcentajes de embriones somáticos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar de semillas de once cultivares de *Citrus*, empleando 4 medios de cultivo: Medio N Sales MS bajo la influencia de $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de extracto de malta. C. Sales MS sin la presencia de reguladores ni coadyuvantes. R. Sales MS con fuentes de nitratos y amonio completos y A. Sales MS con las fuentes de amonio y nitratos diluidos un 200% SDF (Semanas después de floración).

5.1.3 Germinación in vitro de embriones somáticos

Se observó que las mejores respuestas hacia la formación de raíces y tallos (germinación) se obtuvieron a las 6 semanas en los embriones de 5 a 6 mm de diámetro en un medio con las sales MS, suplementado con las vitaminas normales y agregando 0.1 mg/L de AIA, 1.0 mg/L de AG_3 , y 0.1 mg/L de cinetina, llegando a obtener hasta 40% de germinación. En este medio los embriones de 1 a 3 mm se mantuvieron como estructuras verdes sin llegar a germinar. La adición de 500 mg/L de extracto de malta en el medio con las sales MS y suplementos, estimuló la germinación en 60% de embriones con diámetros de 5 a 6 mm; los embriones del 1 a 3 mm aumentaron de tamaño, sin lograr su germinación.

En algunos casos la obtención de plantas completas a través de estos esquemas, ha sido un factor crítico aún cuando se tenga la reproducción de gran número de embriones somáticos pues se han encontrado bajos porcentajes de conversión haciendo muy difícil y prácticamente nula la recuperación de plantas. La adición de 400 mg/L de caseína hidrolizada y 2.0 mg/L de cinetina en el medio básico de MS (Medio G_1) produjeron el desarrollo de raíces y tallos en cuatro semanas en "tangerina" (figura 4), esta respuesta lograda con el empleo de caseína hidrolizada ha sido reconocida para lograr tanto la madurez como la germinación de embriones somáticos (Trigiano *et al.*, 1988).

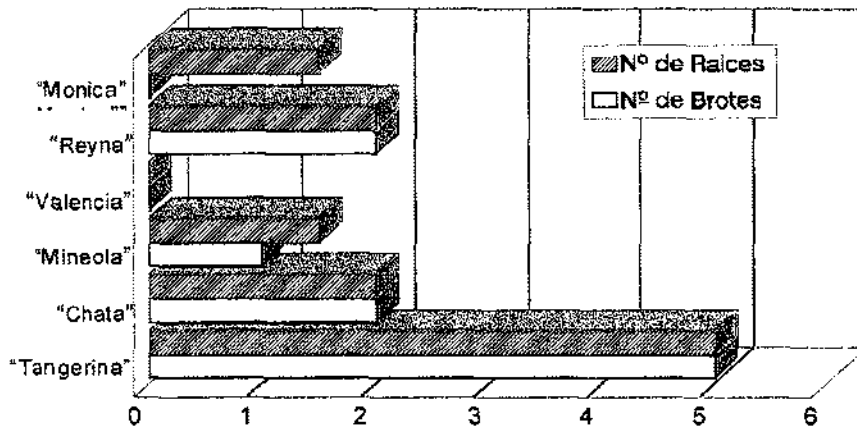


Figura 4. Germinación de embriones nucelares obtenidos *in vitro* en seis cultivares de *Citrus*, en medio de cultivo con las sales inorgánicas de MS, suplementado con 2.0 mg/L de cinetina y 400 mg/L de caseína hidrolizada (Medio G₁).

La proliferación abundante de raíces y poco desarrollo de brotes durante la germinación de los embriones (Fig. 5) se observó a las 4 semanas de cultivo, en los cultivares "Reyna" *C. reticulata*, "Mónica" *C. sinensis* x *C. reticulata* y "Tangerina" *C. reticulata* cuando a las sales inorgánicas de MS se adicionó 0.1 mg/L de cinetina, 0.1 mg/L de AIA y 1.0 mg/L de AG₃ (Medio G₂).

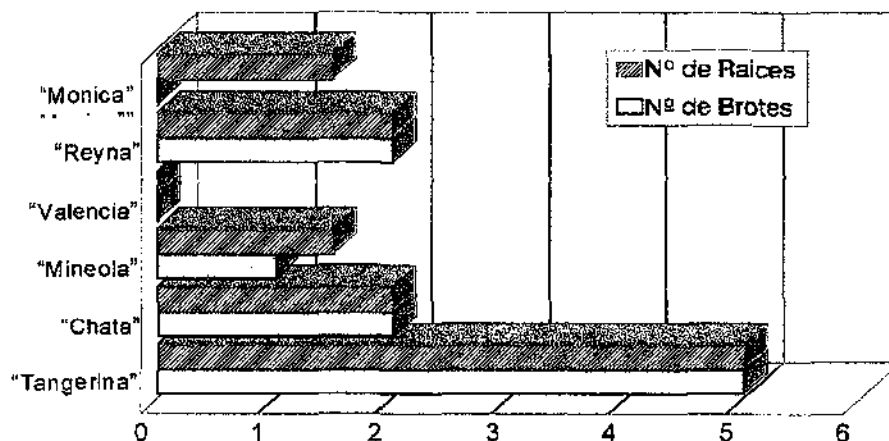


Figura 5. Germinación *in vitro* de embriones nucleares de seis cultivares de *Citrus* empleando un medio con sales de (MS) (1962) al 100% con 0.1 mg/L de cinetina, 0.1 mg/L de AIA y 1.0 mg/L de AG₃ (Medio G₂).

Estas respuestas coincidieron con algunas logradas con los genotipos poliembriónicos (*C. reticulata* y *C. sinensis*), así como la acción debida al AG₃ como efecto primario para estimular el enraizamiento *in vitro* de embriones somáticos en *Citrus* (Moore, 1985). Las sales inorgánicas MS, diluidas al 50% con la incorporación de 5.0 mg/L de bencilaminopurina (BAP) (Medio G₃), promovió la formación de callos en los embriones cultivados *in vitro*. Esto coincide con Gmitter *et al.* (1990) quienes mencionan que la utilización de los niveles elevados de citocininas o de auxinas promueven el establecimiento de callos en muchos de los explantes cultivados *in vitro*.

En los experimentos realizados, la adición de 500 mg/L de extracto de malta al medio con las sales MS y suplementos (Medio G₄) participó como uno de los principales coadyuvantes de la embriogénesis somática en los genotipos de *Citrus*

estudiados. Así mismo, su presencia promovió la germinación *in vitro* de embriones, destacando las respuestas encontradas en "Tangerina", "Valencia tardia" "Chata" y "Reyna". No hubo germinación del cultivar "Mónica " (Figura 6).

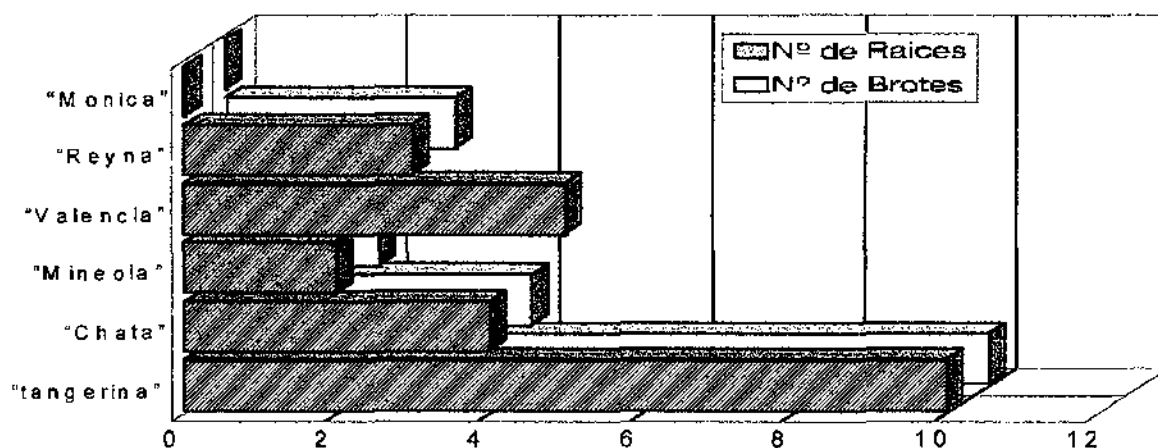


Figura 6. Germinación *in vitro* de embriones nucleares de 6 cultivares de *Citrus*, empleando un medio conteniendo las sales inorgánicas de MS (1962) al 100% y 500 mg/L de extracto de malta (G₄).

La embriogénesis somática obtenida a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar puede ser usada para la clonación de diferentes cultivares de *Citrus* desde el punto de vista de la disponibilidad de cultivares libres de patógenos. Al mismo tiempo puede emplearse como un sistema que permite identificar genotipos con alta capacidad embriogénica para explorar en sus tejidos algunas de las técnicas de transformación genética y aumentar la posibilidad de obtención de mayor cantidad de plantas transformadas.

Una producción continua de embriones o embrioides, como se aprecia en la Figura 7 (A) se puede explicar desde el punto de vista del número de divisiones mitóticas que en forma repetida se puedan presentar en las células individuales, generalmente localizadas sobre la superficie de los tejidos potencialmente embriogénicos. Las células que son destinadas a originar embriones pueden caracterizarse por la densidad de su citoplasma, grandes núcleos, con elevados contenidos de plastidios y almidón, así como densa población de ribosomas y esferosomas.

De hecho, existe continuidad citoplásmica con células vecinas a través de numerosos plasmodesmos cuyas conexiones desaparecen durante el desarrollo de los embriones (Fig. 7,C3). Las características y la habilidad de la conversión de embriones a plantas, incluye la participación de diversos factores como sistemas de cultivo, genotipos balance de reguladores de crecimiento y sobre todo influencia del control genético, ya que hay investigaciones recientes que demuestran que en el desarrollo de embriones somáticos y su germinación (Fig. 8) existe un control con base genética, que evidencia la formación de embriones nucelares en las diferentes especies y cultivares (Charmet y Bernard, 1984).

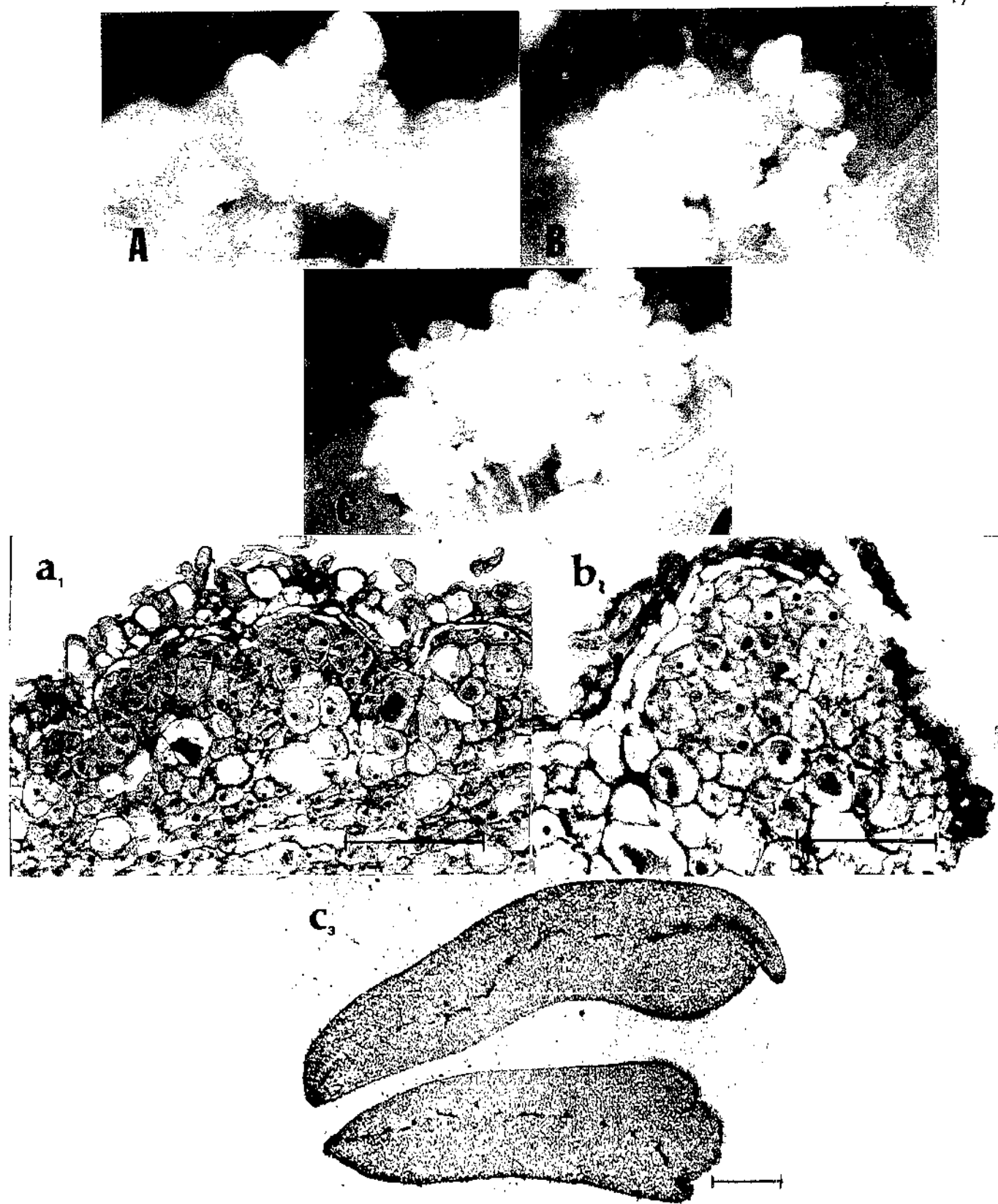


Figura 7. Respuestas *in vitro* (ABC), en la obtención de embriones somáticos a partir de tejido nucelar . Histología (a1, b1, c3) del desarrollo embriogénico celular. Escala= 100 μ M. Hasta conformar embriones somáticos.= 200 μ M. Mandarina " Monica C. *Sinensis* x *C. reticulata*.



Figura 8. (A) Proliferación *in vitro* de embriones somáticos obtenidos a partir de tejido nucelar. (B) Enraizamiento de embriones somáticos *in vitro*. (C) Transferencia y adaptación de plantas a suelo del Cultivar Mandarina Monica *Citrus sinensis* x *C. reticulata*.

5.2 EFECTO DE COADYUVANTES DE LA EMBRIOGÉNESIS EN EL DESARROLLO *in vitro* DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS EN CALLOS DE *Citrus*.

El éxito de los mecanismos de la transformación genética debe basarse en 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, se obtienen mediante el cultivo *in vitro* de diversos tejidos extraídos de la nucela, del endospermo, del epicótilo, de los segmentos de raíz y de los óvulos inmaduros (Hidaka y Kajiura, 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 endospermico, 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 (Rao y Narayanaswamy, 1972).

En cultivo en suspensión, la obtención de plantas completas a través de este mecanismo, representa una excelente alternativa para coadyuvar de manera eficiente con las técnicas de transformación genética.

Entre los principales factores que limitan esta respuesta, esta la imposibilidad de algunos materiales de *Citrus* para formar callos embriogénicos, así como la necesidad de contar con algunos coadyuvantes indispensables como la galactosa, el extracto de malta (Moore, 1985) y el glicerol (Starrantino y Caponetto, 1990). Por otra parte, la capacidad embriogénica de los callos de origen nucelar, se limita muchas veces por la edad de las semillas obtenidas después de la floración (Pasqual *et al.*, 1988), a la presencia de 2,4-D en el medio y ácido abscísico (ABA) (Walker y Sato, 1981).

Aún cuando existen callos con excelente habilidad para formar embriones, existen algunas limitantes que contrarrestan la posibilidad de su explotación, debido a que en *Citrus* las células bajo cultivo *in vitro* pueden estar expuestas a niveles de amonio (NH_4) y nitratos (NO_3) que es posible que resulten tóxicos.

Por lo que algunas estrategias empleadas frecuentemente para disminuir su presencia o substituir al N inorgánico, por otras formas reducidas de N, son la incorporación de aminoácidos, de amidas, como asparagina, glutamina, alanina, L.-prolina y combinaciones de lisina y treonina destacándose el papel de la L-prolina en gramíneas, mejorando mediante su regulación osmótica, el crecimiento de embriones y su calidad y habilidad para convertirlos en plantas (Conger *et al.*, 1983., Armstrong y Green, 1985)

Las respuestas para promover la formación de estructuras embriogénicas en la mayoría de los callos en los 5 cultivares de *Citrus*, fueron escasamente promovidas después de que estos fueron obtenidos *in vitro* utilizando el medio

Los callos subcultivados en el medio MS al 100%, con la adición de 10 ml/L de glicerol y 500 mg/L de extracto de malta, no propició la diferencia de estructura de tipo embriogénica y únicamente se mantuvieron al aumentar la viabilidad, esto se logró hasta en 40%, en los cultivares Jaffa *C. sinensis* y mandarina Rangpure *C. limonia* y 50% en el cultivar Parson Brown *C. sinensis*.

Por otra parte, en la mandarina cultivar "Cleopatra" *C. reshni* la respuesta en cuanto al crecimiento de callos fue poco favorable sobre todo, en los que provenían del tratamiento con el medio MS con 1.0 mg/L de 2,4-D (Fig.9).

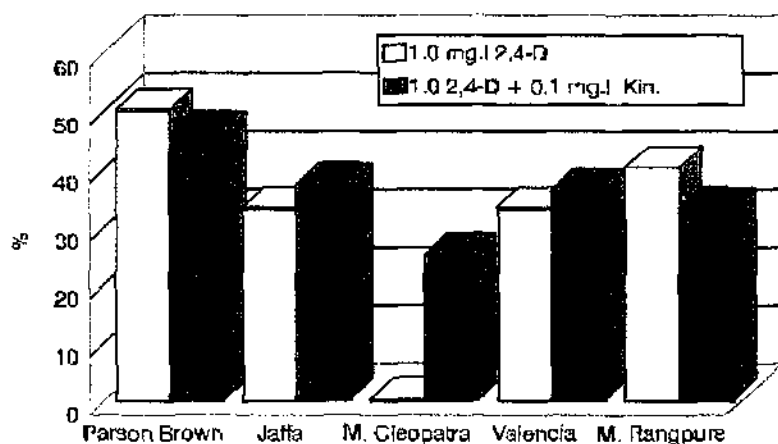


Figura 9. Callos de cinco materiales de *Citrus* derivados de tejido nucelar expuesto a 8 semanas a la acción de 2,4-D y de cinetina. Los porcentajes de crecimiento observado fueron mediante subcultivo en un medio MS (1962), suplementado con vitaminas, 3% de sacarosa, 10 ml de glicerol y 500 mg/L de extracto de malta, después de 6 semanas de cultivo.

Los callos de *Citrus* obtenidos con combinaciones de 2,4-D y cinetina y subcultivados en un medio MS con glicerol y extracto de malta, mantuvieron respuestas homogéneas para diferenciar estructuras embriogénicas o proembriones, de los 5 cultivares evaluados, destacando los callos provenientes del medio con 1.0 mg/L de 2,4-D del cultivar "Jaffa" *C. sinensis* ya que este desarrolló 50% de respuesta hacia la formación de estructuras globulares o proembrionarias, otros porcentajes de alrededor del 33% fueron observados en los cultivares "Valencia" *C. sinensis*. En Mandarina "Rangpure" *C. reshni* no se presentaron respuestas hacia la formación de estructuras embriogénicas o de tipo globular (Fig.10).

Las respuestas embriogénicas esperadas a partir del cultivo de callos, incorporando al medio glicerol y extracto de malta no respondieron ya que el antecedente previo del uso del 2,4-D limitó las respuestas para estos cultivares, aunque por otra parte Vardi *et al.* (1990) reportaron que el efecto de coadyuvantes como el glicerol para promover la embriogénesis *in vitro* se restringe a pocos cultivares de *Citrus*.

Los callos subcultivados de *Citrus* evaluados utilizando los medios de cultivo con glicerol y extracto de malta, después de 8 semanas de cultivo, presentaron fuertes niveles de oxidación, lo anterior corrobora lo reportado por Chaleff y Parsons (1978), con relación a los períodos largos en los que pueden exponer los tejidos o las células a la acción de auxinas como el 2,4-D, cuyos efectos subsecuentes pueden a la larga limitar las respuestas embriogénicas.

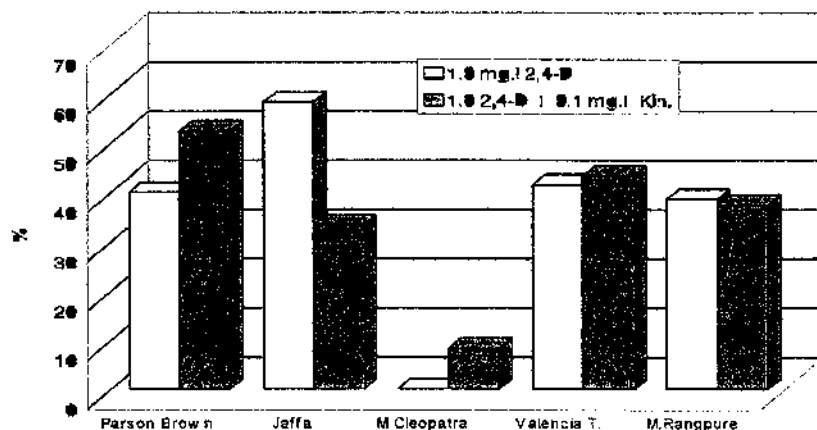


Figura 10. Formación de estructuras proembrionarias de tipo globular, en 5 cultivares de *Citrus*, en callos originados *in vitro* del tejido nucelar en medios con 2,4-D y cinetina y subcultivados en un medio MS al 100%, vitaminas, 3% de sacarosa 10 ml/L de glicerol, y 500 mg/L de extracto de malta, después de 6 semanas.

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

Los diferentes niveles de L-prolina conjuntamente con la participación de coadyuvantes como el extracto de malta disminuyendo 75% el amonio (NH_4), y manteniendo el resto de las sales de MS al 100%, después de 8 semanas de cultivo no estimularon la formación de proembriones en el cultivo *in vitro* de callos de los cultivares de *Citrus* experimentados, de acuerdo con el análisis estadístico realizado, evaluando por otra parte, tanto el crecimiento de callos y los niveles de oxidación únicamente destacó el cultivar "Valencia tardía" *C. sinensis* que mostró diferencias significativas en cuanto al crecimiento de callos y formación de

proembriones, aunque también se pudieron observar fuertes niveles de oxidación (Cuadro 5)

CUADRO 5 EFECTO DE LAS SALES DE MS (1962) AL 100% MAS SUPLEMENTOS, AGREGANDO 500 mg/L DE EXTRACTO DE MALTA Y CUATRO NIVELES DE PROLINA 0.0, 150, 250, 350 mg/L EN 4 *Citrus* EN LA FORMACIÓN DE CALLOS, ESTRUCTURAS GLOBULARES (PROEMBRIONES) Y OXIDACIÓN, DESPUÉS DE 8 SEMANAS.

Variedades	Callos	Estructuras Globulares. (proembriones)	Oxidación
Parson Brown <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.344 b	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
Mandarina Rangpure <i>Citrus limonia</i>	1.219 b	0.969 c	1.813 ab

Utilizando la prueba de D.M.S. con $\alpha = 0.05$

a,b,c,medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas

Por otra parte, en el experimento donde los callos subcultivados se mantuvieron en los mismos tratamientos de L-prolina pero con concentración al 50% las sales de MS y la adición del extracto de malta, los resultados mostraron que las mejores respuestas desde el punto de vista estadístico se lograron con la naranja "Valencia tardía" *C. sinensis* al lado de los otros cultivares, tanto para la formación

de callos y diferenciación de estructuras proembrionarias o de tipo globular, así mismo los callos subcultivados presentaron niveles menores de oxidación (Cuadro 6).

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, la estrategia de incorporar aminoácidos conjuntamente con la disminución del amonio y la adición de coadyuvantes como el extracto de malta tampoco fueron suficientes para estimular la formación de estructuras proembrionarias de manera indirecta, en la mayoría de los cultivares de *Citrus* utilizados. Aunque existe reportes de autores como Conger *et al.* (1983) y Armstrong y Green (1985) que substituyen al N inorgánico con amidas u aminoácidos para estimular en los tejidos o en células la formación de embriones somáticos tanto directamente como en forma indirecta. Otras investigaciones, señalan diferentes frecuencias de embriogénesis somática en *Citrus* dependiendo de la disponibilidad del 2,4-D y de la relación NH_4NO_3 y KNO_3 , siendo más frecuente en un 70 a 77% con 0.01 mg/L de 2,4-D y más con la presencia de amonio y ausencia de nitratos (Song *et al.*, 1991).

CUADRO 6. EFECTO DEL MEDIO CON LAS SALES DE MS DILUIDAS AL 50%, MAS SUPLEMENTOS Y 500 mg/L DE EXTRACTO DE MALTA CON CUATRO NIVELES DE PROLINA 0.0, 150, 250, 350 mg/L EN 4 *Citrus* EN LA FORMACIÓN DE CALLOS, DE ESTRUCTURAS GLOBULARES O PROEMBRIONES Y NIVELES DE OXIDACIÓN. DESPUÉS DE 8 SEMANAS.

Variedades	Callos	Estructuras Globulares	Oxidación
Parson Brown <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.175 b	1.050 bc	1.825a
Jaffa <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	0.800 c	0.850 c	1.775 a
Valencia tardia <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.650 a	1.750 a	1.600 b
Mandarina Rangpure <i>Citrus limonia</i>	1.100 b	1.100 b	1.450 ab

Utilizando la prueba D.M.S. $\alpha = 0.05$

a,b,c,medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

Los tratamientos de glutamina en callos de cuatro cultivares de *Citrus*, en el medio donde disminuyó el amonio (NH_4) al 75% y 500 mg/L 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 cultivar "Valencia tardía" tuvo diferencias estadísticas tanto para la formación de proembriones como en el crecimiento de callos, los niveles de oxidación fueron estadísticamente menores a lo observado en los otros materiales de *Citrus* experimentados (Cuadro 7).

CUADRO 7. EFECTO DEL MEDIO CON LAS SALES DE MS AL 100%, MÁS SUPLEMENTOS Y 500 mg/L DE EXTRACTO DE MALTA Y CUATRO NIVELES DE GLUTAMINA 0,0, 200, 400, 600 mg/L EN CUATRO *Citrus* PARA LAS RESPUESTAS EN LA FORMACIÓN DE CALLO, DE ESTRUCTURAS GLOBULARES O PROEMBRIONES Y OXIDACIÓN, DESPUÉS DE 8 SEMANAS.

Variedades	Callos	Estructuras Globulares	Oxidación
Parson Brown <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.750 a	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
Mandarina Rangpure <i>Citrus limonia</i>	1.344 b	1.031 b	1.781 b

Utilizando la prueba D.M.S. con $\alpha = 0.05$

a,b,c,medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

En el medio de cultivo donde se ensayaron los mismos niveles de glutamina, en callos de los cuatro cultivares de *Citrus*, disminuyendo las sales inorgánicas de MS al 50%, incluyendo la incorporación del amonio (NH_4) al 75% y los 500 mg/L de extracto de malta, mantuvieron al cultivar "Valencia tardía" con las mejores respuestas para la formación de proembriones a partir de los callos cultivados después de las 8 semanas de cultivo (Cuadro 8).

CUADRO 8. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO CON LAS SALES MS AL 50% CON SUPLEMENTOS Y 500 mg/L DE EXTRACTO DE MALTA Y 4 NIVELES DE GLUTAMINA 0.0, 200, 400, 600 mg/L EN CULTIVARES DE *Citrus*, EN LAS RESPUESTAS EN LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS GLOBULARES O PROEMBRIONES Y OXIDACIÓN, DESPUES DE 8 SEMANAS.

Variedades	Estructuras Globulares	Oxidación
Parson Brown <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.292 bc	1.969 a
Jaffa <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.500 ab	1.719 b
Valencia tardia <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1.670 a	1.594 b
Mandarina Rangpure <i>Citrus limonia</i>	1.083 c	-----

Utilizando la prueba D.M.S con $\alpha= 0.05$

a,b,c,medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

En los niveles de prolina probados para promover la embriogénesis somática en forma indirecta, el crecimiento de los callos se mantuvo en forma constante para los cuatro cultivares de *Citrus* evaluados y estadísticamente la interacción entre variedades y medios de cultivo mostraron que las mejores respuestas de crecimiento de callos fue observada en aquellos que provenían del medio con las sales de MS y 1.0 mg/L (Cuadro 9).

CUADRO 9. INTERACCIÓN OBSERVADA DE LOS MEDIOS Y VARIEDADES EN RESPUESTA HACIA LOS INCREMENTOS DE FORMACIÓN DE CALLO, EN CUATRO *Citrus*. PROBANDO CUATRO NIVELES DE PROLINA 0.0, 150, 250, 350 mg/L Y LAS SALES DE MS AL 100%, MÁS SUPLEMENTOS Y 500 mg/L DE EXTRACTO DE MALTA.

Medio	"Parson Brown"	"Jaffa"	"Valencia t"	"Mandarina Rangspure"
MS 1.0 mg/L,2,4-D	1.625 ab	1.688 ab	1.688 ab	1,563 b
MS 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L cinetina	1.063 c	1.000 c	2.063 a	0.875 c

Se utilizó la prueba DMS con $\alpha = 0.05$

a,b,c,medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

Otras evaluaciones estadísticas permitieron observar que en las interacciones entre variedades, medios de cultivo y concentraciones de L-prolina, las mejores respuestas para promover la diferenciación a partir de callos, la formación de estructuras embriogénicas o tipo globular se logró cuando se emplearon 150 mg/L de L-prolina y con las sales MS, disminuyendo 75% el amonio (NH_4) y el resto de las sales al 50% de sacarosa y adicionando 500 mg/L de extracto de malta.

De los cultivares de *Citrus* empleados solo los callos del cultivar "Valencia tardía".

C. sinensis fueron los que presentaron diferencias significativas, observando por otra parte, que el cultivo previo de los callos en medios combinado únicamente 1.0 mg/L de 2,4- D y con 0.1 mg/L de cinetina actuaron también en forma poco

significativa, para promover las respuestas embriogénicas en los callos subcultivados en los distintos niveles de prolina.

Finalmente, la ausencia de glutamina y el nivel de 200 mg/L, promovieron la mejor respuesta para la formación de estructuras embriónicas en los callos subcultivados del cultivar "Valencia tardía" *C. sinensis*.

5.2.2 Cultivo de células en suspensión

Los callos de la mandarina "Mónica" *C. sinensis* x *C. reticulata* fueron puestos bajo agitación y se emplearon 3 medios líquidos de cultivo, no presentaron crecimiento ni desarrollaron proembriones en el medio de Nitsch (1969) sin presencia de reguladores, suplementando con vitaminas y 12 μ M de prolina, 50 μ M de ácido abscísico (ABA) y 6% de sacarosa.

El cultivo de células en suspensión del cultivar "Mónica", desarrolló respuestas embriogénicas hasta formar 60% de embriones, cuando se emplearon las sales MS suplementadas, adicionando 30 μ M de ácido giberélico (AG_3), 500 mg/L de extracto de malta y substituyendo a la sacarosa por 46 g/L de galactosa. El desarrollo del 50% de estructuras embriogénicas y de embriones también se mostró en el cultivo de células en suspensión con las combinaciones de 30 μ M de ácido giberélico (AG_3), 30 mg/L de glicerol, y 500 mg/L de extracto de malta con las sales normales de MS (1962).

De las respuestas logradas bajo el cultivo de suspensión cabe destacar el papel del glicerol y de la galactosa, que diversos autores han identificado como

excelentes promotores de las respuestas embriogénicas en *Citrus* (Gavish *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1992; Vu *et al.*, 1993).

Finalmente, las células que son destinadas para dar origen a embriones, pueden ser diferenciadas por su densidad de citoplasma, grandes nucleos, altos contenidos de plastidios y esferosomas, y con una continuidad citoplasmática entre células vecinas a través de numerosos plasmodesmos que como conexiones desaparecen más tarde durante el desarrollo de los embriones (Street y Witters, 1974). (Fig. 11).

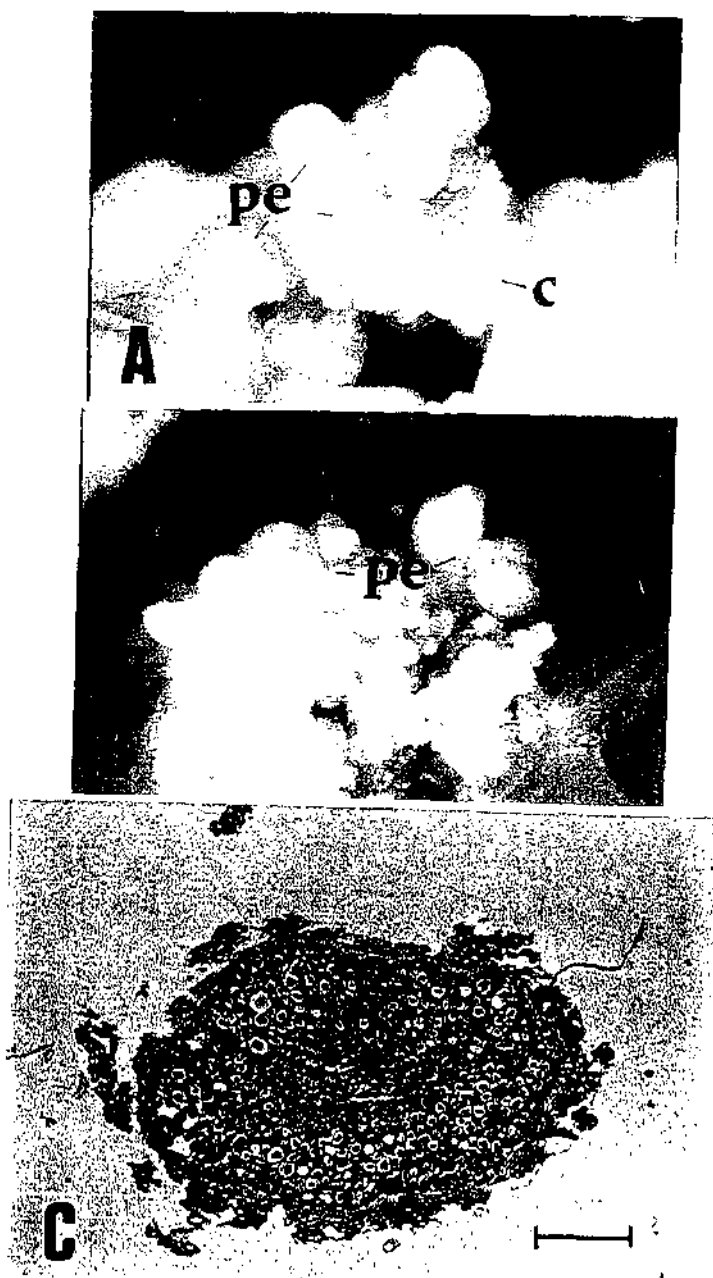


Figura. 11 (A) Etapas preliminares de desarrollo *in vitro* de estructuras proembrionarias (pe) a partir de callos del cultivar Valencia tardía *C. sinensis* L. Osbeck. (B) proliferación de estructuras de tipo globular. (C) Histología de proembriones en etapa globular. (Escala = 200 μ M)

5.3. TRANSFORMACION GENETICA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE MANDARINA cv. MÓNICA *Citrus sinensis* x *C. reticulata* MEDIANTE *Agrobacterium rhizogenes*

En los cultivos vegetales aún cuando actualmente existen diversos sistemas capaces de introducir nueva información genética ó ADN, muchos procesos están limitados por el rango de especies que pueden ser recuperadas o regeneradas *in vitro* a partir de las células o tejidos transformados. La regeneración de plantas vía la embriogénesis somática indirecta *in vitro*, está caracterizada por estimular las constantes divisiones celulares que deriven la formación de callos y que anticipan la obtención de embriones somáticos, lo que puede considerarse como un sistema accesible para realizar la transformación genética mediante su cocultivo con *Agrobacterium rhizogenes*. El cultivo *in vitro* de tejidos nucelares o en otros tejidos como los endospermicos, óvulos y epicótilos, en cultivares de *Citrus* de naturaleza poliembriónica, se puede inducir la proliferación de callos con alta capacidad embriogénica o hacia la regeneración de embriones somáticos y mediante su germinación, derivar plantas completas y su manejo *in vitro* posibilita el empleo de este tipo de estructuras celulares como una alternativa factible de transformación a través de su cocultivo, con la seguridad de que su susceptibilidad hacia la bacteria puede incrementar los niveles de células y de tejidos manipulados y que éstos a su vez puedan derivar en un mayor número de transgénicos. Otra ventaja adicional es que los callos pueden mantener la capacidad de formar embriones

por mucho tiempo en medio de cultivo exentos de reguladores y mostrar poca variación en las plantas regeneradas.

Singh *et al.* (1992), obtuvieron callos embriogénicos a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar en *Citrus meyeri* utilizando el medio de MS, suplementado con diferentes niveles de lactosa 1.5 a 5.0% y de glicerol 1.0 a 4.0%, observando que la embriogénesis es muy estimulada por la presencia de glicerol, aunque los crecimientos máximos del peso fresco de callos se lograron con la lactosa. Por otra parte, Jumin (1995) destaca que los callos embriogénicos de seis especies relacionadas de *Citrus*, combinando 5.0 mg/L de BA, 2.5 mg/L de 2,4-D y 600 mg/L de extracto de malta, empleando un medio MS y Toker (1969) señala que la sacarosa al 5% resulta efectiva para la inducción de callos embriogénicos ubicando posteriormente su habilidad para desarrollar embriones somáticos.

En el cultivo de células en suspensión la embriogénesis sincronizada es muy eficiente de acuerdo con lo observado para *citrus* "Sour Orange" donde destacan los cambios en las fuentes de carbono y substituyendo en el medio a la sacarosa por el glicerol dieron buenos resultados. El desarrollo de los embriones requirió del suplemento continuo del glicerol (Gavish *et al.*, 1991). Los callos nucleares con la presencia de 2,4-D, AIB, cinetina, GA₃, ABA y la glucosa mostraron efectos inhibidores de la embriogénesis. Mientras que de 3 a 8% de lactosa, de 5 a 7% de galactosa y de 1 a 5% de glicerol favorecieron la embriogénesis (Deng *et al.*, 1991).

Por su parte, Vu *et al.* (1993) demostraron intensa actividad enzimática en tejidos en presencia del glicerol lo que estimuló la embriogénesis en callos en crecimiento cuantificando los niveles de almidones y la concentración de azúcares solubles.

Los callos nucelares de *Citrus deliciosa* se mantuvieron sin la formación de embriones empleando a la sacarosa como única fuente de carbono en el medio de cultivo y estimulando la embriogénesis cuando se substituyó por galactosa 0.15 mol (Cabasson *et al.*, 1995), finalmente el extracto de malta 500 mg/L se ha reconocido como un excelente coadyuvante de la embriogénesis somática en callos de *Citrus reshni* (Lorenzo *et al.*, 1994).

En muchas de las investigaciones relacionadas con la transformación genética de plantas, se ha destacado la importancia de contar con la efectividad de un sistema de transformación, tanto para la introducción, como para la integración y la expresión de genes ya sea en las células y en los tejidos. Aunado con lo anterior, también resulta relevante el manejo *in vitro* de éstos para mantener su capacidad para regenerar plantas completas con nueva información genética.

A través del cocultivo de callos embriogénicos con la bacteria *A. rhizogenes* es posible incorporar nueva información genética a células individuales haciéndolas resistentes a antibióticos o a herbicidas, estas características en modelos experimentales se han utilizado como medio de selección, observando las respuestas de división y crecimiento en las células que únicamente han adquirido el gen de la resistencia, reconociendo fácilmente a las que fueron capaces de sobrevivir a estos factores de aquellas que no pudieron transformarse.

Las plantas regeneradas a partir de células transformadas usando este sistema, pueden producir así mismo un número mayor de transgénicas, de tal manera que las células transformadas pueden ser selectivamente multiplicadas, ya sea en forma de callos, o siguiendo una vía embriogénica, es decir obtener embriones y posteriormente mediante su germinación producir plantas completas. Una ventaja

de este sistema de transformación, es que se puede adaptar a los sistemas de regeneración a través de la embriogénesis y obtener un gran número de embriones transformados.

Una limitante, es que las cepas silvestres de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* introduce a las plantas los genes (rol), que aumentan la sensibilidad de los tejidos cultivados debido a los reguladores incorporados *in vitro*, que promueve además del enraizamiento algunas alteraciones morfológicas en las plantas regeneradas (Perez, Molphe-Balch y Ochoa 1997).

Las investigaciones realizadas hasta ahora con la transformación genética de *Citrus*, han sido limitadas por el poco éxito de los sistemas que permiten introducir secuencias de ADN, así como por el hecho de no contar con un sistema eficiente o disponible de regeneración. Kobayashi y Uchimiya (1989) transformaron callos embrionarios mediante la absorción de ADN utilizando polietilenglicol en *Citrus sinensis* (L) Osb. Con una eficiencia de transformación estimada en aproximadamente 1.0×10^{-6} . Por otra parte, Vardi *et al.* (1990), empleando el mismo procedimiento en protoplastos de Limón rugoso *C. Jambhiri* Wsh. Lo obtuvieron nueve clones embrionarios transformados y estables, dos de los cuales regeneraron un número no especificado de plantas transformadas y tampoco mencionan las frecuencias de transformación. Hidaka *et al.* (1990), por su parte, reportaron la transformación de callos nucleares embrionarios de *C. sinensis* con *Agrobacterium* y describieron la regeneración de al menos una planta transgénica, la mejor frecuencia de transformación fue estimada en 7.0×10^{-3} .

El método de transformación antes mencionado puede presentar limitantes, sobre todo en materiales de *Citrus* donde sea difícil inducir la presencia de callos o que tengan poca capacidad embriogénica, aunado al hecho de que en genotipos deseables, se observe una adecuada susceptibilidad a la bacteria (Gmitter y Moore, 1986). Por su parte Moore *et al.* (1992), lograron la transformación genética de *Citrus* siguiendo la recuperación de plantas a través de la organogénesis, el sistema utilizado consistió en emplear entrenudos de tallo co-cultivados con *Agrobacterium*, obteniendo <5% de tallos regenerados en presencia de 100µg/ml de kanamicina y con el análisis de PCR y confirmaron que los tallos contenían t-DNA; al menos dos plantas se establecieron en suelo y mostraron ser transgénicas mediante el análisis de "Southern blot".

Este método puede ser efectivo, en plantas cuando se cumplen ambos requisitos con la bacteria y tienen habilidad para regenerar plantas a partir de los tejidos cultivados y hasta ahora son pocas las especies que presentan en forma eficiente ambas respuestas. Por lo que una estrategia sería seleccionar o caracterizar previamente a los genotipos con la seguridad de llevar a cabo su transformación y la recuperación eficiente de los transformantes. En *Citrus*, en contraste con otros árboles frutales, es relativamente sencillo desarrollar sistemas de embriogénesis *in vitro*, lo cual proporciona una oportunidad excelente para establecer cualquiera de los sistemas de transformación genética hasta ahora conocidos.

La transformación de células durante la fase de callo, brinda la oportunidad de lograr su modificación en forma anticipada a la diferenciación de estructuras de tipo organogénico o bien a la formación de embriones somáticos y por lo tanto

evitar la aparición de quimeras. Para el caso de la inducción de la embriogénesis, se pueden establecer los ciclos repetidos para la fase de callos, llegando a considerarlo como un sistema importante mediante el cual se puede obtener un amplio rango de plantas transgénicas, y es así mismo posible contribuir al mejoramiento de los métodos de transformación para futuras aplicaciones biotecnológicas, el problema es definir las condiciones que se requieren para un desarrollo normal y para la maduración de embriones. La embriogénesis como sistema de transformación genética ha sido llevada a cabo en especies como alfalfa (Deak *et al.*, 1986; Chabaud *et al.*, 1988), algodón (Umbeck *et al.*, 1987) girasol (Everett *et al.*, 1987) y papa (Filippone y Lurquin 1979).

La técnica de transformación incluye el empleo de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, con tejidos en la fase de callos y posteriormente puestos a la proliferación de raíces y plantas completas a partir de células transformadas. Lo anterior se ha reportado para pepino (*Cucumis sativus*) (Trulson *et al.*, 1986), alfalfa (Sukhapinda *et al.*, 1987).

En *Citrus* otro sistema para ensayar la transformación genética es el cultivo de células en suspensión utilizando el cañón de micropartículas o pistola de genes, las micropartículas que pueden ser de oro, plástico o de tungsteno son cubiertas con plásmidos y secuencias de ADN, que una vez impactadas en células embriogénicas pueden llevar el gen *uidA* que codifica para β -glucuronidasa (Gus), y el gen *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina. Jia-Long *et al.* (1996), reportaron el logro en *Citrus* hasta de 600 transformantes con expresión transitoria y 15 estables con base en la expresión de Gus, en 1 a 8 días después del bombardeo. Los callos expresaron resistencia a la kanamicina y hacia la actividad

de Gus. Posteriormente estos callos derivaron en embriones y plántulas. La integración de los genes *uidA* y *nptII* al genoma de los *Citrus* fue confirmada mediante análisis de PCR y "Southern blot."

Los resultados obtenidos de la transferencia genética utilizando el sistema de embriogénesis somática indirecta para la transformación genética de callos de *Citrus*, utilizando el sistema de *A. rhizogenes*, permitió observar de manera eficiente los niveles de expresión del gen reportero Gus en los substratos empleados azul(x-glu) y magenta, así como evaluar el crecimiento de células transformadas después de 7 y 8 ciclos de selección en medios de selección empleando kanamicina. En los resultados de transformación obtenidos fue determinante la fase previa, tanto la selección como la caracterización de callos con una alta capacidad embriogénica en los cultivares de *citrus* explorados. La capacidad para formar embriones a partir de células en callos cultivados como fase previa a su diferenciación, puede presentarse como un excelente sistema para lograr su transformación mediante *Agrobacterium*. Los niveles alcanzados de transformación de células en el cultivar "Mónica" *Citrus sinensis* x *C. reticulata*, se explican en parte porque se requirió de la evaluación previa de diferentes cultivares de acuerdo a su capacidad embriogénica *in vitro*, lo que permitió detectar las mejores respuestas en cultivares y el cultivar "Mónica" de naturaleza poliembriónica, se presentó como uno de los mejores en cuanto a su capacidad embriogénica nucelar desarrollada tanto de manera directa como indirecta (formación de callos y de embriones). Las respuestas en este cultivar se observaron en los medios de cultivo conteniendo las sales inorgánicas MS substituyendo los niveles de sacarosa, por 46 g/L de galactosa y 28 ml de glicerol.

permitiendo observar en los callos una elevada capacidad de respuesta embriogénica, caracterizándose además por la uniformidad y calidad en los embriones formados, estas respuestas en la diferenciación *in vitro* de los callos, facilitaron su caracterización y posteriormente se utilizaron como sistema para experimentar su transformación mediante su cocultivo con *A. rhizogenes*, los resultados de acuerdo con pruebas de tipo histoquímico mostraron que los callos transformados presentaron niveles adecuados de expresión del gen Gus, en los dos substratos empleados (x-glu y magenta) tanto en medios líquidos como sólidos, los porcentajes de expresión obtenidos en células fueron en todos los casos superiores al 80% y 90% (Cuadro 10).

Cabe señalar que todas las células absorbieron al gen Gus y su detección por tinción ya sea azul (x-glu) o magenta, dependió del substrato empleado y los porcentajes encontrados solo muestran el número de células que sobrevivieron a la transformación utilizando ocho ciclos de selección en el medio con kanamicina.(comunicación personal de Pérez-Molphe Balch 1999).

La ventaja de la transformación mediante *Agrobacterium* en sistemas de embriogénesis indirecta, es que una vez transformados los callos pueden ser cultivados continuamente para producir una gran cantidad de embriones, Este sistema también ha sido reportado exitosamente en alfalfa por D'Halluin *et al.* (1990), y en *Cucumis sativus* por Sukhapinda *et al.* (1987). De acuerdo con Parrot *et al.* (1988), la única limitante es caracterizar la especie de planta que resulte altamente manejable al sistema de *Agrobacterium* y mantenga su habilidad embriogénica.

En *Citrus* aunque la transformación genética utilizando el sistema *Agrobacterium* se ha realizado a nivel de protoplastos (Hidaka y Omura, 1990) en patrones como Naranja trifoliada (Kaneyoshi *et al.*, 1994) y *Citrango carrizo* (Peña *et al.*, 1995), la eficiencia de la transformación ha sido muy baja, de tan sólo 4 a 8% en segmentos de tallos inoculados (Moore *et al.*, 1992), por lo que se justifica explorar otros sistemas adicionales para transferir ADN a otros cultivares de *Citrus*. En el limón mexicano *Citrus aurantifolia* se han probado diferentes cepas de *A. rhizógenes* en inóculos de internodales de tallo para, posteriormente, mediante la organogénesis obtener brotes y raíces transformados reportando una eficiencia de 29 y 11% y los más bajos de 6 y 8% (Perez Molphe-Balch y Ochoa 1998).

CUADRO 10. RESULTADOS DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS CO-CULTIVADOS CON *A. rizhogenes* EN MEDIOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS DE *Citrus* MANDARINA CULTIVAR MÓNICA *C.sinensis* x *C. reticulata*. DESPUÉS DE OCHO CICLOS DE SELECCIÓN EN MEDIOS CON KANAMICINA .

1. Callos cultivados en medio sólido

Número de células (☒)	Substrato azul (x-glu)	(%)	$\delta\pm$
1480	1255	84.42	\pm 1.26

Número de células (☒) Substrato (Magenta)

2273	2016	88.8	\pm 1.08
------	------	------	------------

2. Callos cultivados en medios líquidos

Número de células (☒)	Substrato azul(x-glu)	(%)	$\delta\pm$
2037	1843	90.3	\pm 1.25

Número de células (☒) Substrato (Magenta)

2211	1989	89.1	\pm 2.46
------	------	------	------------

5.3.1 Niveles de expresión del gen reportero Gus y crecimiento celular

Como se pudo apreciar anteriormente los niveles de transformación en las células de los callos co-cultivados con *A. rhizógenes* mantuvieron respuestas adecuadas en la expresión del gen Gus en los dos substratos empleados (Figura 12 a,b,c), y en tratamientos con magenta (Figura 13 a,b,c). Las células transformadas aunque no fueron llevadas a la diferenciación de embriones-planta con el empleo de medios de cultivo en presencia de reguladores del crecimiento, se mantuvieron en el medio de selección que contenía kanamicina. Estas características de crecimiento y eficiencia, en cuanto a los niveles de expresión de Gus en *Citrus aurantifolia*, ha sido reportado por Perez Molphe-Balch y Ochoa (1998) en medios sin la presencia de reguladores de crecimiento y siguiendo la organogénesis *in vitro*, obtuvieron raíces transformadas y regeneración de brotes con respuestas favorables hacia la expresión del gen gus. Jiao-long *et al.* (1996), reportaron el empleo del cañon de partículas para la transformación de células embriogénicas de tangelo cuya estabilidad y resistencia a la kanamicina fue observada durante 2 a 3 meses después del bombardeo, este método permitió la integración de genes como el *uidA* y *nptII* siendo posteriormente confirmada la transformación mediante pruebas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el "Southern blot."

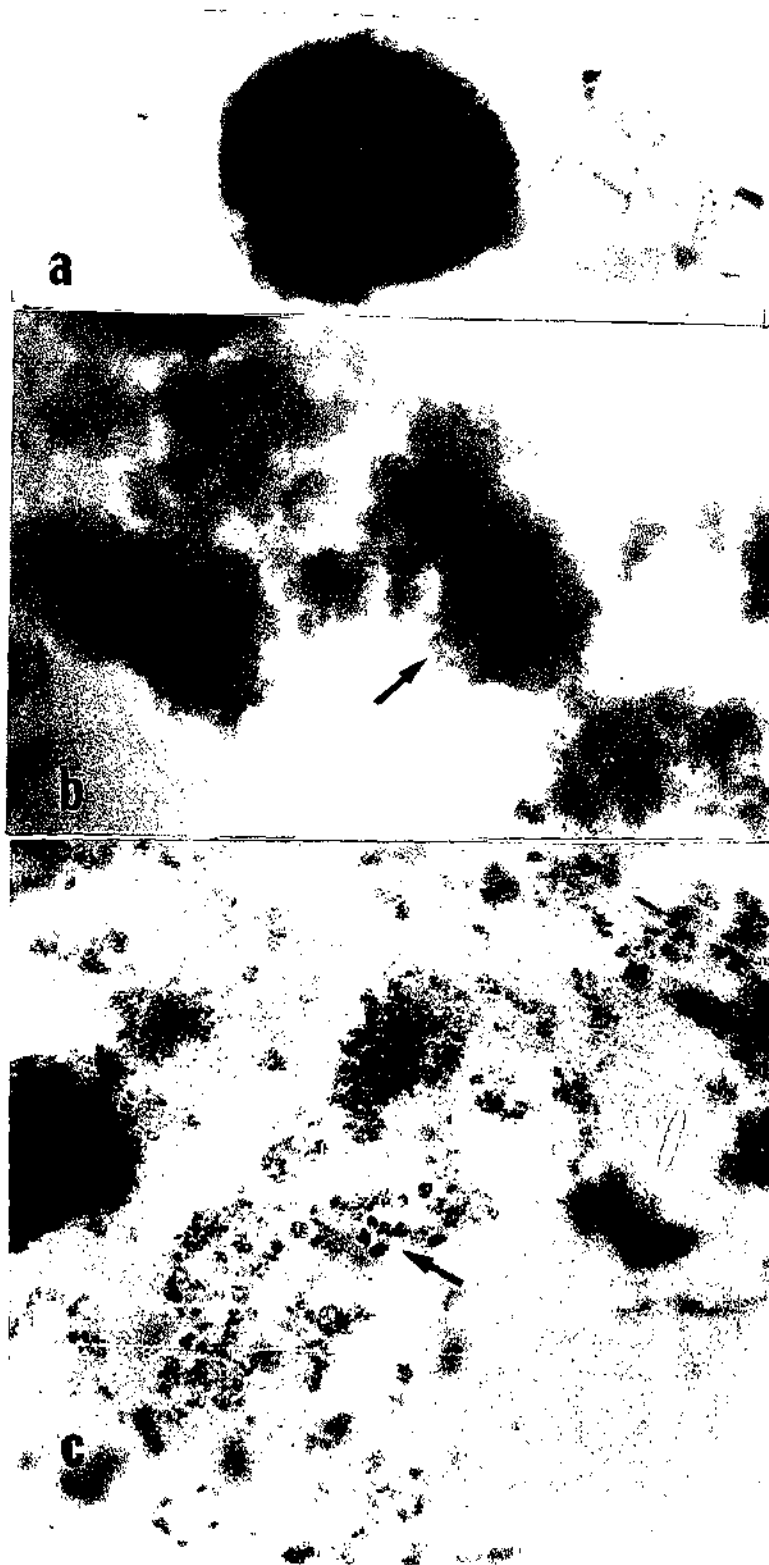


Figura 12(a) Niveles de expresión del gen GUS en callos de origen nucelar de *Citrus. cv. Monica Citrus sinensis x C. reticulata*, (b) efecto de la citasa en la disgregación de callos (c) Células transformadas con 5-bromo-4chloro-3 indolyl- β -D-glucuronidasa, después de 24 hrs. de co-cultivo con *A. rhizogenes*

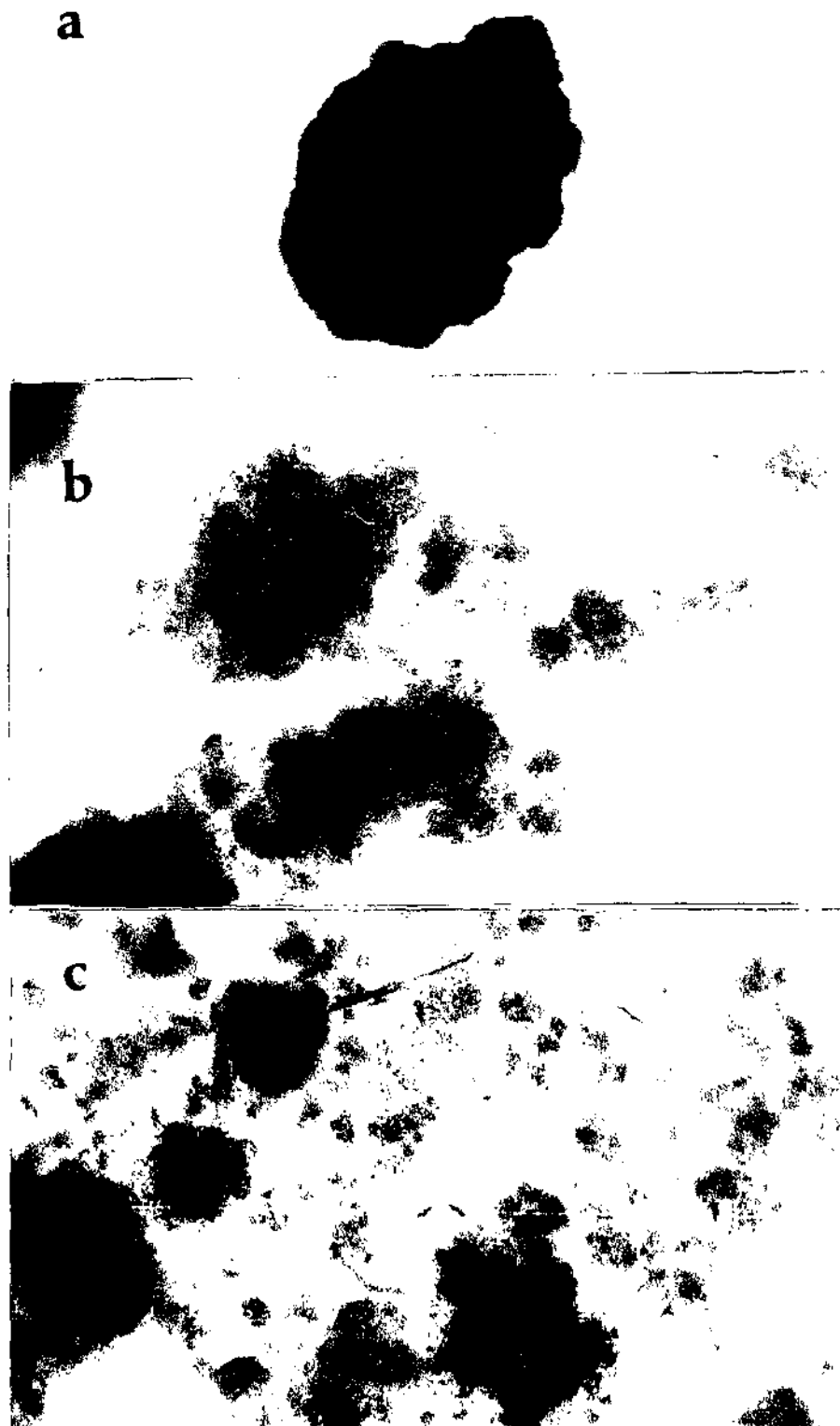


Figura 13 (a) Niveles de expresión del gen Magenta en callos embriogénicos de origen nuclear en *Citrus* cv. Mónica *Citrus sinensis* X *C. reticulata* (b). Efecto de la citasa en la disgregación de callos (c). Células transformadas con 5-bromo-6-cloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (Magenta glucuro CHAsat) Co-cultivadas con *Agrobacterium rhizogenes*.

6. DISCUSION GENERAL

La capacidad para producir embriones somáticos tanto de manera directa como indirecta en diversos cultivares de *Citrus* estuvo muy influenciada por el genotipo, la edad de las semillas, la disponibilidad de nitratos y de amonio en los medios de cultivo, así como a la aplicación *in vitro* de coadyuvantes como el extracto de malta, la galactosa y el glicerol.

De las fuentes reportadas para inducir la embriogénesis, se comprobó que el tejido nucelar sembrado de las semillas *in vitro* puede ser un sistema eficiente para inducir de manera uniforme la producción de embriones de acuerdo con los resultados observados en algunos cultivares.

Existen varios antecedentes de embriogénesis somática en *Citrus* que destacan que durante su manejo *in vitro* puede presentarse este fenómeno sin los reguladores del crecimiento, ya que algunos tejidos tienen como condición predeterminada esta característica, así mismo, se ha reconocido en algunos casos que los niveles de sales inorgánicas en diferentes medios de cultivo resultan tóxicas, por lo que su dilución resulta necesaria para estimular la aparición de embriones *in vitro*.

Otro de los factores que estimularon la embriogénesis *in vitro* fue el empleo de los coadyuvantes, destacándose de la galactosa, el glicerol y el extracto de malta. De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo observar que los tejidos nucleares en la mayoría de los cultivares de *citrus* estudiados, presentaron respuestas hacia la formación de embriones con el 2,4-D y cinetina, y que las concentraciones empleadas de estos reguladores fueron determinantes, no obstante que en las

plantas regeneradas, también su efecto también provocó un desecamiento en las regiones apicales y por lo tanto limitaron su crecimiento.

La regeneración de plantas *in vitro* juega un papel fundamental para clonar genotipos deseables y su variabilidad *in vitro* puede o no considerarse un factor desahable, por lo que resulta necesario evaluar el número de ciclos de multiplicación *in vitro*, sin que con esto puedan promoverse la aparición de nuevos cambios constitutivos en las plantas obtenidas.

La embriogénesis somática estudiada a partir del cultivo *in vitro* del tejido nucelar, presenta dos alternativas de regeneración de embriones, una directa, que asegura la obtención de embriones somáticos de calidad, aunque las respuestas en algunos cultivares no rebasaron el 40 y 60% adicionalmente con la ventaja de aceptar que se puede presentar escasa o nula variación en los embriones originados, manteniendo su identidad genética con la planta donadora, por otra parte las respuestas embriogénicas de manera indirecta, es decir con la formación preliminar de callos, facilita el mayor escalamiento en la producción de embriones, aunque se tengan ciertas limitantes de respuestas regeneradoras debido al subcultivo repetido de los callos, así como la posibilidad de originar por variabilidad nuevos cambios constitutivos en las plantas resultantes.

De los diferentes cultivares de *Citrus* evaluados, los monoembriónicos *C. paradisi* presentaron escasez de semillas y las mejores respuestas embriogénicas, sucedieron en los tejidos nucleares de las semillas de materiales de naturaleza poliembriónica, la regeneración *in vitro* de embriones somáticos tanto de manera directa como indirecta, en los cultivares *Citrus sinensis* y una cruce entre este, y el *C. reticulata* como el cultivar Mónica guardaron una correlación directa con los

resultados obtenidos. Este mismo tipo de repuestas se presentó hasta 60% en forma positiva cuando la disponibilidad de amonio y de nitratos fue disminuida hasta 200% en los materiales poliembriónicos, aunque mayor cantidad de cultivares respondieron mejor cuando las sales MS se incorporaron completas y se adicionó en forma complementaria 600 mg/L de nitrato de sodio (NaNO_3).

De acuerdo con lo anterior, el éxito para la recuperación de plantas en los trabajos de transformación genética es apoyado eficientemente, con el uso de cultivares poliembriónicos con una amplia capacidad regeneradora o embriogénica además de la determinación de un medio de cultivo adecuado. Cabe destacar que la fase experimental para la inducción de la embriogénesis *in vitro* en *Citrus* consistió en probar diversas fuentes de explantes como segmentos de cotiledones, hoja, raíz y tallos y la influencia de diversos coadyuvantes como la caseína hidrolizada, ácido ascórbico, sulfato de adenina, manitol y extracto de malta.

Cuando se emplearon otros tipos de explantes, muchas respuestas derivaron principalmente en callos, con incrementos observados en cuanto a su peso fresco, su constitución física en algunos tratamientos fue ubicada de acuerdo con sus características de textura y color, sin embargo, la capacidad para regenerar embriones fue muy limitada o no se alcanzó.

El manejo *in vitro* de células a partir de callos embriogénicos ofrece una excelente estrategia para la multiplicación de plantas en forma masiva o de acuerdo con el reporte de otros trabajos, aprovechar la variabilidad genética que pueda resultar de las plantas obtenidas. Básicamente en algunas especies vegetales al aplicar las técnicas de transformación genética, se busca la manera eficiente de insertar, integrar, expresar, y heredar las características genéticas incorporadas, ya sea en

células o tejidos, por lo que la regeneración de plantas a partir de éstos, ubica a estas técnicas como elementos indispensables, que permiten coadyuvar de manera conjunta la aplicación eficiente de estos procesos.

El sistema de recuperación de plantas a través de la embriogénesis somática indirecta permite incrementar los niveles de transformación a nivel de células, con la posibilidad de que los transgenes sean incorporados eficientemente y expresados en las plantas regeneradas posteriormente.

En la embriogénesis somática obtenida tanto directa como indirectamente se ha reportado la participación de innumerables factores, entre los que se destacan para diferentes cultivares de *Citrus*, diversas fuentes de explante, medios de cultivo, reguladores y empleo de coadyuvantes. En este tipo de trabajos, se le ha dado una particular importancia al crecimiento, y a la maduración de embriones *in vitro*, que les permita una germinación adecuada (conversión) hasta lograr plantas completas.

Para algunos cultivares de *Citrus* se presentan fuertes limitantes tanto para la obtención como para la multiplicación de callos y más aún para que a partir de estos se obtengan embriones somáticos. Las estrategias de manejo *in vitro*, desde el punto de vista de la regeneración de plantas deben involucrar la caracterización genotípica en cuanto a su capacidad de respuesta de tipo organogénico o embriogénico y debida a esta última si es a través de la vía indirecta, será necesario caracterizar a los callos desde el punto de vista de su origen y tomando en cuenta su capacidad para derivar de una manera uniforme la producción de embriones.

**ESTA TESIS NO DEBE
CAER DE LA BIBLIOTECA**

Las principales respuestas embriogénicas en callos de origen nucelar en diferentes materiales de *Citrus* permitieron precisar el efecto de la galactosa, del glicerol y del extracto de malta, para inducir la proliferación de embriones. El subcultivo de callos en los medios de cultivo identificados tanto para el crecimiento como para la diferenciación presentaron limitantes después de 8 y 12 semanas de cultivo, aunque hay autores que se refieren a esta característica aprovechable por mucho tiempo en el cultivo *in vitro* de células embriogénicas en *Citrus*, sin la necesidad del empleo de reguladores del crecimiento. Los callos embriogénicos de origen nucelar fueron fácilmente disgregados al ser sometidos a cultivo en suspensión y cuando a los medios se les adicionó de manera conjunta la galactosa, el ácido giberélico, y el extracto de malta, en tan sólo 4 y 6 semanas éstos se derivaron en estructuras globulares y embriones.

Otro de los medios de cultivo que promovió este tipo de respuestas en células fue la adición de glicerol, ácido giberélico, y el extracto de malta, por otra parte, cuando se agregaron aminoácidos como la L-prolina y la glutamina no se promovió la embriogénesis en el cultivo de células en suspensión, tampoco en el cultivo de callos en medios de cultivo en forma sólida. Los callos derivados del tejido nucelar, mostraron diferencias en cuanto a su capacidad embriogénica y dependió del medio y de sus constituyentes. Desde la germinación hasta la obtención de plantas no se observó ninguna variante ocasionada por el manejo *in vitro* de tejidos o por el genotipo empleado.

La aplicación de técnicas biotecnológicas novedosas relacionadas con el mejoramiento mediante la transformación genética, buscan como estrategia optimizar la eficiencia de la transformación en vista de que hasta ahora en muchos

procedimientos han resultado muy limitada la incorporación, la integración y la expresión del ADN o las características deseables incluidas dentro de los tejidos o células receptores, por lo que la recuperación *in vitro* de plantas completas a partir de éstos es un aspecto primordial para el avance y la aplicación de estas técnicas, la otra preocupación es que las características incorporadas se mantengan y se hereden en forma estable.

Por lo anterior es importante buscar y experimentar otros sistemas que aumenten la eficiencia de la transformación genética. La investigación realizada mantuvo inicialmente como estrategia la caracterización de cultivares de *Citrus* de acuerdo con su capacidad embriogénica a partir de callos como un sistema para su transformación genética por co-cultivo mediante *Agrobacterium rhizogenes*, y de acuerdo con los resultados obtenidos, este sistema de transformación puede presentarse como una excelente alternativa para incrementar los niveles de transformación a partir de células embriogénicas, ya que permitió la expresión eficiente del gen reportero Gus en los dos substratos empleados, así mismo pudo apreciarse el crecimiento de células transformadas en medios de selección con kanamicina, sin embargo, será necesario continuar con el proceso de diferenciación celular hasta obtener plantas completas y realizar en ellas las pruebas correspondientes como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o "Southern blot", para evaluar la eficiencia de este mecanismo de transformación. Es posible concluir que los niveles alcanzados de expresión del gen reportero GUS en las células embriogénicas de *Citrus*, no marcan un resultado que mida la eficiencia de transformación, o si esto represente o tenga correlación positiva en este procedimiento, por lo que resulta primordial continuar con los experimentos

que permitan promover la diferenciación hasta obtener plantas completas a partir de las células transformadas y realizar las pruebas correspondientes que permita determinar y cuantificar la eficiencia de este sistema de transformación.

7. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con las etapas establecidas y los resultados observados en la presente investigación se puede concluir que el tejido nucelar de semillas de *Citrus* puede resultar una alternativa para la formación de embriones somáticos *in vitro* en diferentes cultivares y a través de la formación de callos embriogénicos, esta característica se puede incrementar ya que las células cultivadas mantienen la capacidad de formar embriones y su cocultivo con *A. rhizogenes* permite incrementar eficientemente los niveles de su transformación genética.

La presencia de coadyuvantes y la disponibilidad de amonio y nitratos, así como la edad y el genotipo de las semillas jugaron un papel importante en las respuestas embriogénicas obtenidas en los cultivares evaluados.

En las principales respuestas para la formación de embriones somáticos obtenidos tanto de manera directa como indirecta, influyó en forma definitiva la naturaleza poliembriónica del cultivar y desde el punto de vista de esta característica, son los que tendrían mejores posibilidades de obtener mayor cantidad de transformantes.

En el manejo *in vitro* de células y tejidos en *Citrus*, se destacó la influencia de los coadyuvantes de la embriogénesis como la galactosa, el glicerol y el extracto de malta. Cuando células y tejidos se cultivaron en tratamientos con 2,4-D, se notó un efecto inhibitor en las regiones apicales de las plantas obtenidas.

Las respuestas embriogénicas en los dieciséis diferentes cultivares de *Citrus* de acuerdo con su manejo *in vitro* permitieron identificar al cultivar "Mónica" *Citrus sinensis* X *C. reticulata* sobresaliendo en las respuestas para la obtención de embriones en células y tejidos cultivados *in vitro*.

El manejo de callos para inducir la obtención de embriones con el empleo de aminoácidos L-prolina y glutamina fue muy limitada en los cinco materiales evaluados y solo la naranja valencia tardía *C. sinensis* respondió favorablemente a los tratamientos para originar estructuras embrionarias de tipo globular.

Las estrategias biotecnológicas aplicadas en *Citrus*, hace necesaria la formulación de estudios que conlleven la formación de embriones y de callos embriogénicos a partir del tejido nucelar o de otras fuentes en cultivares monoembriónicos, cuyo valor comercial o económico puede ser muy importante desde el punto de vista de buscar su mejoramiento, dando prioridad a su manejo *in vitro* que permita, a través de la embriogénesis u organogénesis, asegurar la recuperación de plantas completas.

La eficiencia del sistema de transformación empleado requirió de una evaluación previa de materiales de acuerdo con su capacidad regeneradora o embriogénica, en la agroinfección experimentada mediante *Agrobacterium rhizogenes* la transformación dependió únicamente de la susceptibilidad de las células a la infección y de la expresión del gen Gus.

La investigación continuará evaluando la capacidad para recuperar plantas a partir de células y tejidos transformados. En los resultados logrados se observó el crecimiento de células transformadas en medios de selección con kanamicina y se mantuvieron en forma estable el gen reportero incorporado, por otra parte, se sugiere precisar los tiempos de cocultivo, entre células y bacteria, ya que como pudo observarse los períodos largos, disminuyen las respuestas para regenerar, a partir de células, embriones y posteriormente plantas. Por otra parte debe de considerarse el establecimiento de protocolos de regeneración de plantas de

Citrus a partir de otros explantes potencialmente embriogénicos como óvulos inmaduros, segmentos de hoja, epicótilos y endospermo.

7.1 CONCLUSIONES DE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA DIRECTA

El presente estudio permitió identificar las respuestas embriogénicas obtenidas en forma directa a partir del cultivo *in vitro* del tejido nucelar en semillas de los diferentes cultivares de *Citrus* empleados, destacándose en cuanto al genotipo los de naturaleza poliembriónica, así mismo se pudo apreciar una fuerte heterogeneidad de respuestas, debido principalmente a la madurez de las semillas, al genotipo y a la influencia de los coadyuvantes del medio de cultivo.

El balance de nitrato-amonio, vitaminas y extractos de malta suministrados de acuerdo con la fórmula de MS, favorecieron la producción de embriones somáticos en más de 50% de los cultivares, no obstante cuando se disminuyó la disponibilidad de nitrato-amonio, solo cuatro genotipos presentaron respuestas y destacándose el cultivar poliembriónico "Mónica" *C. sinensis* x *C. reticulata* con 60% de respuesta. La relación 2,4-D y cinetina permitió por una parte optimizar las respuestas embriogénicas en casi 80%, en semillas con tan sólo 8 semanas después de haber llevado su floración.

Cabe destacar que los medios de cultivo que derivaron callos embriogénicos, fueron utilizados posteriormente para realizar las pruebas de transformación genética, caracterizando a los callos de acuerdo con su capacidad regeneradora o embriogénica hasta contemplar la obtención de plantas completas.

7.2 CONCLUSIONES DE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA INDIRECTA.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir, que los tratamientos previos con 2,4-D y kinetina en el cultivo *in vitro* de tejido nucelar, influyeron de manera fundamental limitando en la formación y subcultivo de callos. Las respuestas embriogénicas, en medios de cultivo con la presencia de coadyuvantes de la embriogénesis no promovieron respuestas favorables para la formación de embriones en la mayoría de los cultivares de *Citrus* explorados.

La diferenciación tanto de estructuras globulares o proembrionarias así como embriones a partir del subcultivo de callos fue muy limitada. Únicamente algunas respuestas se observaron en el cultivar "Valencia tardía" *C. sinensis* Osbeck, tanto en el desarrollo *in vitro* de estructuras embriogénicas de tipo globular a partir de los callos subcultivados, utilizando medios de cultivo adicionando aminoácidos y coadyuvantes.

La estrategia de utilizar en los medios de cultivo los aminoácidos L-prolina y la glutamina, modificando la presencia de amonio y niveles de sales, conjuntamente con la adición de otros coadyuvantes de la embriogénesis somática de *Citrus*, no promovió en la mayoría de los cultivares la proliferación uniforme de embriones somáticos y a partir de los callos subcultivados.

La investigación realizada en diferentes cultivares de *Citrus* corrobora los innumerables reportes que destacan el efecto inhibitor de la embriogénesis somática, la presencia *in vitro* y la acción de reguladores como el 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); el ácido indolbutírico (AIB), la cinetina, el ácido giberélico (AG₃) y el ácido abscísico (ABA) (Deng *et al.*, 1991).

Los medios de cultivo ensayados en forma líquida promovieron la formación de embriones y callos con alta capacidad regeneradora, destacando entre los cultivares la naturaleza poliembriónica de la mandarina "Mónica" *Citrus.sinensis* x *C. reticulata*, e identificando en el subcultivo de callos tanto al glicerol y a la galactosa como excelentes promotores de la embriogenesis somática *in vitro*.

7.3 CONCLUSIONES SOBRE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CALLOS

El trabajo realizado con relación a la transformación genética de callos embriogénicos obtenidos del tejido nucelar de *Citrus*, utilizando el mecanismo de cocultivo con *A. rizhogenes*, propició la expresión del gen Gus en células, empleando los dos substratos tanto medios de cultivo en forma sólida como en líquida (suspensión).

De acuerdo con las pruebas histoquímicas, la cantidad de células transformadas en los dos substratos empleados azul (x-glu) y Magenta superaron el 80% y 90% (con expresión del gen Gus), las líneas celulares mantuvieron en forma estable estas características al gen y su crecimiento después de 7 y 8 ciclos de selección en medios con kanamicina.

Los tiempos de cocultivo limitaron la diferenciación de embriones a partir de las células transformadas, por lo que tampoco se observó la regeneración de plantas, aún cuando fue posible observar el crecimiento de células transformadas en medios de selección con kanamicina.

Este sistema de transformación puede ser aplicado posteriormente a otros cultivares de *Citrus*, en la medida de que se establezcan adecuadamente los tiempos de cocultivo (bacteria-células) y en la medida en que los diferentes genotipos puedan caracterizarse previamente por sus elevadas respuestas embriogénicas o regenerativas. Sobre esto último considerando la calidad y la uniformidad en cuanto al desarrollo de embriones *in vitro*, así como a partir de éstos recuperar plantas completas.

Finalmente, ha sido muy importante observar, que recientemente dentro del avance tecnológico que se ha tenido sobre el uso de diferentes técnicas para llevar a cabo la transformación genética tratando de incorporar en plantas nuevos o novedosos caracteres asociados a sistemas o fuentes de resistencia hacia factores de tipo biótico como abiótico, llegándose a establecer por investigadores diversos puntos de vista y preocupaciones al momento de liberar estas plantas al medio como organismos modificados genéticamente, sobre todo por su impacto y riesgo que pudiera significar para la salud humana, animal o ecológico. De hecho, estas preocupaciones han sido motivo de amplias discusiones y análisis en diversos foros regionales e internacionales y parten del hecho de que aún en estos momentos se desconoce, como van a incidir varios factores involucrados al momento de llevar a cabo la manipulación genética o que resultados podemos esperar en los organismos cuyo intercambio genético se haya efectuado con información a fin o no biológicamente. Así como por ejemplo existen dudas sobre: la cantidad y el lugar donde el ADN foráneo se inserta dentro del genoma del organismo recipiente, así como su estabilidad y herencia, en las plantas u organismos resultantes. De hecho, en plantas manipuladas se han manifestado

serias dudas sobre si el transgen incorporado pueda llegar a provocar o no alteraciones de tipo constitutivo ya sea tanto en sus características organolépticas, fisiológicas, o morfológicas. Sobre lo anterior un aspecto particularmente importante resulta sobre lo que pudiera llegar a presentarse, con el empleo de la ingeniería genética de plantas para introducir fuentes de resistencia a virus, se cree primero, que el riesgo se pudiera presentar ante la imposibilidad de mantener o alterar la relación biológica natural entre huésped y patógeno, esto propiciaría que el agente infeccioso (el virus) pudiera llegar a modificar su estructura como un mecanismo natural de sobrevivencia, haciendo posible con esto crear nuevas razas o formas quizás mucho más virulentas o más agresivas, o por otra parte, que modifique su capacidad infecciosa hacia otros cultivos o hacia otras regiones geográficas. Lo que sí podemos observar y reconocer es el avance alcanzado dentro del desarrollo biotecnológico en muchas áreas del conocimiento y sobre todo en el vegetal, o al que tiene que ver con las plantas, que es el que últimamente ha venido evolucionando en forma rápida y constante tanto para la producción de semillas o alimentos, es por ello que estos avances nos hacen suponer que en el futuro cercano, lo que ahora pudiera representar un riesgo o una preocupación, más adelante con la aplicación de alguna tecnología novedosa se pueda superar o corregir y con ello, contribuir con los satisfactores que demande la humanidad.

8. REFERENCIAS

- Armstrong, C.L. y Green, C. E. 1985. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-Proline. *Planta* 164: 207-214.
- Ben-Hayyim, G. y Neumann, H. 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 110: 331-337.
- Button, J. y Botha C.E.J. 1975. Enzymatic maceration of Citrus callus and regeneration of plants plants from single cell. *J. Exp. Bot.* 26: 723-729.
- Cabasson, C., Ollitrault, P., Cote, F.X., Michaux-Ferriere, N., Dambier, D., Dalnic, R. y Teisson, C. 1995. Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. *Physiol. Plant.* 93: 464-470
- Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P. y Teisson, C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 50: 33-37.
- Carimi, F., De Pasquale, F. y Giulio, F.C. 1995. Somatic embryogenesis in *Citrus* from style culture. *Plant Sci.* 105: 81-86
- Carimi, F., De Pasquale, F. y Crecimanno, F.G. 1994. Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*). *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 37: 209-211.

- Christou, P. 1990. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by delivery integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. *Ann. Bot.* 66: 379-386.
- Conger, B., G. E., Henning, C. E., Gray, D. J. y Mc Daniel, J.K.L. 1983 Direct embryogenesis from mesophyll cell of orchardgrass. *Science* 221: 850-851.
- Chabaud, M., Passiatore, J.E., Cannon, F. y Buchanan-Wollaston, V. 1988. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 7: 512-516
- Chaleff, R.S. y Parsons, M.F. 1978. Isolation of glycerol-utilizing mutant of *Nicotiana tabacum*. *Genetics* 89: 723-728.
- Charmet, G. y Bernard, S. 1984. Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid triticale (*Triticum secale* Wittmack). *Theor. Appl. Genet.* 69: 55-61.
- Christou, P., Swain, W.F., Yang, N.S. y McCabe, D.E. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 86: 7500-7504
- Chupeau, M.C., Bellini, C., Guerche, P., Maisonneuve, G., Vastra, G. y Chupeau, Y. 1989. Transgenic plants of lettuce *Lactuca sativa* obtained through electroporation of protoplast. *Bio/Technology* 7: 503-8.
- D'Halluin, K., Botterman, J. y De Greef, W. 1990. Engineering of herbicide-resistance alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Sci.* 30: 866-71.

- De Pasquale, F., Carimi, F. y Crescimanno, F.G. 1994. Somatic embryogenesis from style of different cultivars of *Citrus limon* (L) Burm. Aust. J. Bot. 42: 587-594.
- Deak, M., Kiss, G.B., Koncz, C. y Dudists, D. 1986. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Plant Cell Rep. 5: 97-100.
- Deng, Z.A., Zhang, W.C y Wan, S. Y. 1991. Induction of somatic embryogenesis from habituated nucellar calluses in *Citrus*. J. Fruit Sci. 8: 193-200.
- Everett, N.P., Robinson, K.E.P. y Mascarenhas, D. 1987. Genetic engineering of Sunflower *Helianthus annus* L. Bio/Technology 5: 1201-4 .
- Fabergé, A.C. 1945. Snail stomach cytase, new reagent for plant cytology. Stain Technol. 20: 1-4.
- Filippone, E. y Lurquin, P.F. 1989. Stable transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) by cocultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector. Plant Cell Rep. 8: 370-3.
- Gambley, R.L., Ford, R. y Smith, G.R. 1993. Microprojectile transformation of sugarcane meristem and regeneration of shoot expressing β -glucuronidase. Plant Cell Rep. 12: 343-346.
- Gavish, H., Vardi, A. y Fluhr, R. 1991. Extracellular proteins and early embryo development *Citrus* nucellar cell cultures. Physiol. Plant. 82 : 785-790.
- Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. y Gosal, S.S. 1994. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of "Kinnnow" mandarin (*Citrus mobilis* Lour X *C. deliciosa* Tenora). J. Hortic. Sci. 69. 231-236.

- Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. y Gosal, S.S. 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Scientia Hort. 63: 167-174.
- Gmitter, F.G. Ling, X. B. y Deng, X.X. 1990. Introduction of triploid *Citrus* from endosperm calli *in vitro*. Theor. Appl. Genet. 80: 785-790.
- Gmitter, F.G. y Moore, G.A. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus* embryo production, germination and plant survival. Plant Cell Tissue Org. Cult. 6: 139-147.
- Gmitter, F.G., Grosser, J.W. y Moore, G.A. 1992.) Biotechnology of perennials fruit crops. En: F.A. Hammerschlang y R.E. Litz (Eds. C.A.B. International pp. 335-369
- Grosser, J. W. 1994. *In vitro* culture of tropical fruits. En: *Plant Cell and Tissue Culture* (K. Vasil y A. Thorpe, Eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 475-495.
- Grosser, J.W. y Gmitter, Jr., F.G. 1990. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. Plant Breed. Rev. 8: 339-374.
- Hidaka, T. y Kajiura, Y. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplast induced from *Citrus* embryos. Scientia Hort. 34: 85-92.
- Hidaka, T. y Omura, M. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture regeneration from protoplast and attempt to callus bank. Bull. Fruit Tree Res. Stn. (Okitsu) 16: 1-17.

- Hidaka, T., Omura, M., Ugaki, M., Tomiyama, M., Kato, A., Oshima, M. y Motoyoshi, F. 1990. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. for suspension cells. *Jpn. J. Breed.* 40: 199-207
- Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Shilperroot, R.A. y Horsch, A. 1977. Transfer of the *A. tumefaciens* *Ti* to a virulent *Agrobacterium rhizobium* explant. *J. Gen. Microbiol.* 98: 477-484
- Jia-long Y., Jin-Hu, W., Andrew, P., Gleave, B. y Morris, M. 1996. Transformation of *Citrus* using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Sci.* 113: 175-183.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.N. 1987. Genes fusion: beta glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jofre-Garfias, A.E., Villegas, S.N., Cabrera, P.J.L., Adame, A.R.M., Herrera, E.L. y Simpson, J. 1997. *Agrobacterium* mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: Light and tissue specific expression of a pea chlorophyll a/b binding protein promotor. *Plant Cell Rep.* 16: 847-852.
- Jumin, H.B. 1995. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Citrus* and its relatives. *Phytomorphology* 45: 1-8.
- Kaneyoshi, J.S., Kobayashi, Y., Nakomura, N., Shigemoto, Y. y Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of Trifoliate orange (*Porcirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Rep.* 13: 541-545
- Kinnersley, A.M. y Henderson, W. E. 1988. Alternative carbohydrates promote differentiation of plant cells. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 15: 3-16.

- Maheshwari, P. y Ranga-Swamy, N.S. 1958. Polyembryony and *in vitro* culture of *Citrus* and *Mangifera*. Ind. Hort. 15: 275-286.
- Maheshwari, P., y Sachar, R.C. 1963. En: *Recent advances in the embryology of angiosperms* (P. Maheshwari, Ed.). Int. Soc. Plant Morphologist, Univ. of Delhi, Dehli, pp. 265-296.
- Mathias, R.J. 1987. Plant microinjection technique. Genet. Engin. 9: 199-227.
- Moore, G.A. 1985. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 66-70.
- Moore, G.A. 1986. *In vitro* propagation of *Citrus* rootstocks. HortScience 21:300-301.
- Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidinger, J.L., Lawrence, S.D. y Cline, K. 1992. *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep. 11: 238-242.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 373-397.
- Murashige, T. y Tucker, D.P.H. 1969. Growth factors requirement of citrus tissue culture. In Proc. First Int. Citrus Symp. Vol 3, 1155-1161 Univ. of Calif Riverside. CA.
- Murashige, T. y Witters, L. A. 1969. Growth factors requirements of *Citrus* tissue culture. Proc. First Inter. Citrus Symposium. 3: 115-1161. Univ. of Calif. Riverside. CA.
- Navarro, L. Ortíz, J. M. y Juárez, J. 1984. Aberrant *Citrus* plants by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. Hortscience 20:214-215.

- Spiegel- Roy, M. y Vardi, P.A. 1984. *Citrus* In: *Handbook of cell culture* (P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp y Yamada, Eds.) Mac Millan Publ., Nueva York, pp. 335-372
- Starrantino, A. y Caponnetto, P. 1990. Effect of cytokinins on embryogenetic callus formation from undevelopment ovules of orange. *Acta Horticulturae* 280: 191-194.
- Street, H.E., y Witters, L.A. 1974. Cell (suspension) cultures -techniques En. *Tissue culture and plant science*, 1974 (H.E. Street, Ed.). Academic Press, Nueva York. pp. 71-100.
- Sukhapinda, K., Spivey, R. y Shahin, E.A. 1987. Ri-plasmid as a helper for introducing vector DNA into alfalfa plants. *Plant Molec. Biol.* 8, 209-16.
- Thomas, J.C., Guiltinan, M. J., Bustos, F. y Nessler, T.C. 1989. Carrot *Daucus carota* hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 8: 354-7.
- Trigiano, R.N., Beaty, R.M. y Graham, E.T. 1988. Somatic embriogenesis from inmadure embryos of redbud *Cercis canadiensis*. *Plant Cell Rep.* 7: 148-150.
- Trulson, A. J., Simpson, R.B. y Shahin, E.A. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L) plants with *Agrobacterium rizhogenes*. *Theor. Appli. Genet.* 73. 11-15.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K. y Swain, W. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biol/ Technology* 5: 263-6.

- Vardi, A., Bleichman, S. y Aviv 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. y. Yelenosky, G. 1993. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis embryogenesis and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus on Hamlin Sweet Orange. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33: 75-80
- Walker, K.A. y. Sato, S.J. 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* the role of ammonium in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 1: 109-121.
- Wann, S.R. 1988. Somatic embryogenesis in woody species. *Hort. Rev.* 10: 153 - 177.
- Yao, J.L., Cohen, D., Atkinson, R., Richardson, K. y Morris, B. 1995. Regeneration of transgenic plants from the comercial apple cultivar Royal gala. *Plant Cell Rep.* 14: 407-412.
- Zheng, Z. L. y Chen, L.G. 1994. Embryogenesis in *Citrus*. *J. Fruits Sci.* 11: 48-52