

# Capítulo 12

## Cultivo de embriones y óvulos

R. E. Litz\*

---

\* Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U.

## Introducción

El cultivo de embriones se ha usado para diferentes propósitos, como los de estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos que se hayan derivado de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, producir monoploides y superar la latencia de las semillas. Igualmente, el cultivo de óvulos intactos se ha empleado para el rescate de embriones (mediante la polinización y fertilización in vitro) y para inducir embriogénesis somática a partir de nucelas de algunas especies de plantas. En algunos artículos recientes se han hecho revisiones de estas áreas.

El desarrollo de los embriones vegetales se caracteriza por dos estados distintos: el estado temprano, que es heterotrófico, y el estado tardío, que es autotrófico. Los embriones globulares heterotróficos se desarrollan a expensas del endosperma y poseen una baja capacidad de síntesis; el desarrollo de los embriones en estado de 'corazón' depende de ciertos nutrimentos como hormonas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, purinas y pirimidinas que se encuentran en el saco embrionario.

Con la formación de los cotiledones, el embrión pasa a ser autótrofo y se puede aislar de los óvulos y cultivarse in vitro en un medio relativamente simple, que contenga pequeñas cantidades de unos pocos nutrimentos. Diversos estudios con cruzamientos interespecíficos demostraron la importancia del normal desarrollo del endosperma en el desarrollo del embrión. Renner (1914) observó que los embriones híbridos originados de cruzamientos entre *Oenothera biennis* y *O. muricata* y entre *O. biennis* y *O. lamarckiana* crecieron inicialmente en forma normal, pero más tarde tuvieron un crecimiento muy lento debido a la desintegración del endosperma después de la fertilización.

Brink et al. (1947) sugirieron que el aborto de los embriones después de una hibridación amplia se debía probablemente al rompimiento del equilibrio entre el material que constituye los tejidos ovulares, el embrión en desarrollo y el endosperma. El aborto embrionario puede resultar también de anomalías en el desarrollo, lo que se refleja en un funcionamiento alterado del cigoto; en consecuencia, las anomalías del suspensor afectarán la toma de nutrimentos (Blakeslee et al., 1944).

De acuerdo con Esen et al. (1973), la presencia de un embrión híbrido puede debilitar la formación del endosperma. Esto explica el hecho de que cuando se cruzan cultivares diploides y tetraploides de *Citrus*, muchas semillas con un endosperma normal no tienen embrión, mientras semillas con embriones tienen usualmente un endosperma anormal.

El aborto de los embriones, como respuesta a la hibridación interespecífica, puede provocar la proliferación nucelar; este hecho se ha descrito en *Medicago* (Ledingham, 1946), *Datura* (Satina et al., 1950) y *Solanum* (Beamish, 1950), y también en los cruzamientos de *Nicotiana rustica* con *N. glutinosa*, o con *N. tabacum* (Brink et al., 1941). Este fenómeno fue también descrito con respecto al cruzamiento de especies de *Lycopersicon* de diferentes niveles de ploidía (Cooper et al., 1944).

Es posible que los embriones híbridos posean una capacidad sintética más baja que los embriones que resultan de la autofecundación. Esto se aprecia al comparar el desarrollo de embriones obtenidos por autofecundación de *Hibiscus costatus* con el de los embriones híbridos de *H. costatus* con *H. aculeatus*, o con *H. furcellatus* (Asley, 1972).

## Cultivo de Embriones

Hanning (1940) fue el primero en demostrar que es posible remover de los óvulos de la planta los embriones de cigotos maduros, y cultivarlos en un medio estéril que contenga los nutrimentos esenciales; en este medio los embriones se pueden desarrollar normalmente y germinar. Laibach (1925; 1929) obtuvo cultivos relativamente exitosos de embriones híbridos maduros procedentes del cruzamiento incompatible de *Linum perenne* x *L. austriacum*, y de ellos recuperó plantas normales.

Raghavan (1976), en una revisión de los avances realizados en el cultivo de embriones de varias especies económicamente importantes, señala entre ellos los siguientes: la hibridación entre algodón americano tetraploide y algodón asiático diploide (Joshi et al., 1966); la obtención de híbridos del cruzamiento incompatible entre *Lycopersicon esculentum* y *L. peruvianum* (Smith, 1944; Choudhury, 1955; Alexander, 1956); y la transferencia, en el tomate, de resistencia al mosaico y al virus del marchitamiento así como a varias enfermedades producidas por hongos y por el nematodo de la raíz.

El cultivo de embriones ha sido efectivo en el mejoramiento de la cebada, al permitir rescatar los embriones que resultan de la hibridación entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*; el híbrido es resistente a las bajas temperaturas invernales y al mildew (Konzak et al., 1951). Mediante la aplicación de esta técnica se han logrado algunos cruzamientos intergenéricos; por ejemplo, Cooper et al. (1944) cruzaron *Hordeum jubatum* con *Secale cereale*, un cruzamiento en el cual el desarrollo embrionario in vitro termina de 6 a 13 días después de la fertilización.

Otra aplicación del cultivo de embriones es el rescate de material de propagación en los frutales deciduos cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad (Tukey, 1934; Blake, 1939; Danielsson, 1950); también ha servido para obtener híbridos en especies como peras y albaricoques, en las cuales se presenta aborto de los embriones (Lammerts, 1941).

El cultivo de embriones ha ayudado al mejoramiento genético de especies arbóreas porque acorta el período siembra-floración; los embriones cultivados in vitro no necesitan un período de latencia anterior a la germinación. Asimismo, ha sido efectivo para acortar el ciclo de mejoramiento de *Iris* spp., porque acorta el período de latencia de las semillas que oscila entre unos pocos meses y varios años; esta latencia se debe a algunos inhibidores del crecimiento del embrión presentes en el endosperma (Randolph et al., 1943) y en la cubierta de la semilla (Lenz, 1955). Por medio del cultivo de embriones, es posible acortar la latencia y producir plántulas para el trasplante a las 2 ó 3 semanas.

### Factores que afectan el cultivo

**Medio de cultivo.** En los primeros estudios relacionados con el cultivo de embriones aislados se usó ampliamente la solución de Knop, aunque actualmente se considera que no es un medio óptimo.

El medio modificado de Murashige et al. (1962) parece estar más cerca del medio ideal (Monner, 1978) si se alteran las concentraciones de ciertos componentes. Por ejemplo, la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento de embriones en forma de corazón es de 120 g/litro; existe en los embriones inmaduros en cultivo una tendencia a germinar precozmente, dando como resultado plántulas deformes con una probabilidad relativamente baja de sobrevivir (Dietrich, 1924); los niveles altos de sacarosa previenen la germinación precoz y proveen una fuente de carbohidratos mejor que otros azúcares.

Para embriones aislados de óvulos muy jóvenes se usan algunos medios relativamente complejos; los nutrimentos pueden incluir aminoácidos, vitaminas y varios extractos de plantas, además de los componentes orgánicos y minerales del medio. El agua de coco (AC), no procesada en el autoclave pero esterilizada por medio de filtración, ha sido muy benéfica para el cultivo de embriones de ciertas especies de plantas (van Overbeek, 1941); con la adición de glutamina o CH aumenta su efecto (Norstog, 1961). Los extractos del endosperma de otras plantas o del mesocarpo de los frutos tienen también un efecto estimulante en el crecimiento y desarrollo de los embriones.

**Osmolaridad.** El endosperma líquido empleado en los medios para embriones muy jóvenes tiene una osmolaridad alta (Kerr et al., 1944); incrementando la concentración de sacarosa en el medio es posible cultivar embriones muy jóvenes provenientes de varias especies de plantas. La sustitución de compuestos metabólicamente inertes, como el manitol o el glicerol, por sacarosa sugiere que el 2% de esta sustancia provee las condiciones energéticas óptimas para el crecimiento, mientras que el óptimo de osmolaridad puede variar dependiendo del estado de desarrollo del embrión aislado (Rietsema et al., 1953).

Monnier (1978) describió el uso de un sistema para cultivar embriones inmaduros. El medio de cultivo, que contiene una concentración alta de sacarosa, está ubicado en el centro del recipiente de cultivo y rodeado a su vez de otro medio que contiene una concentración más baja de sacarosa. Después de un tiempo, la osmolaridad en la parte central del recipiente de cultivo se reduce debido a la difusión de agua desde el medio que lo rodea; este fenómeno provee un gradiente continuo de concentraciones de sacarosa durante el desarrollo embrionario.

**Reguladores del crecimiento.** El efecto de los reguladores del crecimiento en el cultivo de embriones no es muy claro. Raghavan (1976) ha sugerido que el control hormonal del desarrollo embrionario puede estar correlacionado con el control físico del mismo cuando se mantiene una osmolaridad alta del medio.

## Procedimiento para el cultivo de embriones de papaya

La papaya (*Carica papaya*) es susceptible al virus del anillo de la papaya (PRV) mientras que *C. cauliflora* es resistente, y esta resistencia se confiere a través de un solo gen dominante. Sin embargo, *C. cauliflora* y *C. papaya* son sexualmente incompatibles; aunque el embrión se desarrolla durante 1 a 2 meses después de la polinización, aborta generalmente a los 60 ó 70 días debido a que el endosperma no se desarrolla.

El procedimiento para rescatar los embriones híbridos comprende los siguientes pasos (Khuspe et al., 1980):

- 1) Remover las semillas de papaya de los frutos inmaduros, 2 meses después de la polinización con *C. cauliflora*; esterilizarlas con alcohol de 70% durante 5 minutos y dejarlas luego en una solución del 20% (v/v) de NaOCl de uso doméstico, durante 10 a 15 minutos. Después de enjuagar tres veces con agua destilada, las semillas se cortan para remover el embrión.

Los embriones están dentro del ambiente estéril del saco embrionario; de allí se pueden aislar con facilidad, aunque esta operación se debe hacer minuciosamente con el fin de evitar daños al mismo embrión o al suspensor (particularmente si los embriones son muy inmaduros). El aislamiento del embrión se facilita cuando el endosperma no se ha desarrollado. Otra alternativa consiste en aislar el embrión conjuntamente con la cubierta del integumento.

- 2) Inocular los embriones en un medio de cultivo estéril. En este caso se usa el medio basal de White (1954), el cual tiene 20 g/litro de sacarosa, 0.25 mg/litro de molibdato de sodio, 0.27 mg/litro de cloruro de cobre, 8 g/litro de agar, y un pH ajustado a 5.7 antes de su esterilización; ésta se hace en el autoclave durante 15 a 20 minutos a 1.1 kg/cm<sup>2</sup> y 121 °C. Cualquier recipiente (tubo de ensayo, caja Petri) es adecuado.
- 3) Incubar los embriones en la oscuridad a una temperatura de 25 °C durante 30 días. Al cabo de este tiempo se producirá una limitada germinación.
- 4) Trasferir las plántulas obtenidas a condiciones de luz (1.2 klux) con un fotoperíodo de 12 horas, durante 2 a 3 semanas.
- 5) Después de ese tiempo, colocar las plántulas (5 cm) en un medio de cultivo que contenga vitaminas y CH (400 mg/litro). En el lapso de otras 2 a 3 semanas se obtienen plántulas suficientemente vigorosas para el trasplante.
- 6) Trasferir las plántulas a una mezcla de turba y vermiculita (en la proporción de 1:1) y colocarlas bajo un rocío intermitente durante aproximadamente 2 semanas. Como alternativa, la planta se puede encerrar con su maceta en una bolsa de plástico durante 2 semanas, hasta cuando esté suficientemente vigorosa.

Todas las disecciones y transferencias se deben realizar en una cámara estéril, y todos los instrumentos se deben esterilizar antes de usarlos. Las disecciones se deben hacer con bisturí no. 11; para efectuar el aislamiento del embrión es necesario utilizar un microscopio de disección.

## **Cultivo de Ovulos para la Hibridación**

En ciertos cruzamientos interespecíficos, el cultivo de un óvulo completo ha sido más efectivo para el rescate de embriones que el cultivo del embrión

aislado. Cuando se dejan intactas las frágiles estructuras embrionarias (por ejemplo, el suspensor o el embrión globular mismo), hay menor posibilidad de que el embrión se dañe; además, el cultivo del óvulo intacto puede ayudar a la absorción de nutrientes por el embrión. Haynes (1954) observó que el cultivo de embriones intactos de papa con 16 células, con preacondicionamiento durante unos pocos días, les permitió sobrevivir y desarrollarse mucho más rápidamente que los embriones aislados y cultivados mientras completaban su tiempo de desarrollo. Cuando se comparó el cultivo de óvulos con el cultivo de embriones de *Hevea brasiliensis* se obtuvieron resultados similares (Muzik, 1956).

Withner (1942) cultivó óvulos resultantes de cruces interespecíficos de ciertas especies de orquídeas y pudo acortar así el período entre la fertilización y la maduración de las semillas de esas plantas.

La inducción de poliembriónia en óvulos in vitro ha sido posible en varias especies incluyendo *Anethum* sp. (Johri et al., 1963), *Foeniculum vulgare*, *Trachyspermum ammi*, *Ammi majus* y *Coriander sativum* (Johri et al., 1966). Litz et al. (1981) describieron la poliembriónia in vitro en óvulos derivados de la hibridación de *Carica papaya* con *C. cauliflora*, lo que incrementa la eficiencia de la hibridación.

El cultivo de óvulos se ha usado para rescatar embriones derivados de cruzamientos interespecíficos. Así se obtuvo un híbrido entre especies de algodón del viejo y del nuevo mundo (Joshi, 1962; Joshi et al., 1972). Litz et al. (1982, 1983) y Moore et al. (1984) usaron el cultivo de óvulos para rescatar embriones de *Carica papaya* x *C. cauliflora*. El cultivo de óvulos también ha sido útil para rescatar híbridos intergenéricos, por ejemplo entre *Lolium perenne* x *Festuca rubra* (Nitsche et al., 1976) y para rescatar embriones abortados en uvas sin semilla, variedad Thompson (Emershad et al., 1984).

## Factores que afectan el cultivo

**Placenta.** La velocidad del desarrollo embrionario en los cultivos de óvulos se puede aumentar, algunas veces, por medio del cultivo de óvulos con la placenta todavía adherida a ellos (Chopra et al., 1963). La placenta de *Capsicum* puede estimular el desarrollo de los óvulos trasplantados de varias especies de diferentes familias (Melnick et al., 1964).

**Osmolaridad.** La concentración osmótica del medio afecta el desarrollo de los embriones separados y también el cultivo de óvulos (Wakisuka et al., 1974). Los óvulos de *Petunia hybrida*, removidos y cultivados tres días

después de la polinización, requieren 8% de sacarosa mientras que los cultivados 4 días después de la polinización requieren 6% de sacarosa.

**Reguladores de crecimiento.** El AC esterilizada por filtración (Sachar et al., 1959) y la KIN (Maheshwari, 1958; Maheshwari et al., 1961), usadas conjuntamente, estimulan el crecimiento y el desarrollo de embriones en los cultivos de óvulos. La CH usada junto con el AC han sido efectivas para el desarrollo de óvulos de *Abelmoschus esculentus* (Bajaj, 1964).

## Procedimiento para el cultivo de óvulos de papaya

Litz et al. (1982 y 1983) idearon el siguiente procedimiento:

- 1) Cosechar los frutos inmaduros de papaya entre los 30 y los 70 días después de que se ha efectuado la polinización con polen de *C. cauliflora*. La superficie de cada fruto se esteriliza durante 30 minutos con una solución de 20 a 30% (v/v) de NaOCl, de uso doméstico; después de esto no es necesario lavar con agua destilada. Los frutos se dividen longitudinalmente con un cuchillo estéril y los óvulos se remueven usando pinzas esterilizadas.
- 2) Sembrar los óvulos en cajas Petri previamente esterilizadas. El medio de cultivo es el de Murashige y Skoog (1962), modificado por la adición de 60 g/litro de sacarosa, de 400 mg/litro de glutamina, de 8 g/litro de agar, de 20% (v/v) de AC esterilizada, y de 1 a 2 mg/litro de BAP. El pH se debe ajustar a 5.7 antes de someter el medio al autoclave, a 1.1 kg/cm<sup>2</sup> y 121 °C, durante 15 minutos.
- 3) Incubar los cultivos a 25 °C bajo una fuente de luz (1.1 klux) con un fotoperíodo de 16 horas. Después de 5 a 6 semanas, la mayoría de los óvulos más inmaduros se abren dejando libre una masa de embriones, y de callo derivado del embrión híbrido. Los óvulos más maduros se deben disectar con el fin de determinar si el embrión se ha desarrollado o si la poliembrionía ha sido inducida.
- 4) Subcultivar el callo. Se puede usar el mismo medio, pero añadiendo 2 mg/litro de 2,4-D en lugar de BAP o AC, para incrementar la cantidad de callo; esto ocurre más eficientemente en medio líquido. La embriogénesis somática es evidente cuando el callo híbrido se subcultiva en un medio libre de 2,4-D. La maduración y la germinación de los embriones somáticos derivados de los embriones sexuales (resultantes del cruzamiento entre *C. papaya* y *C. cauliflora*) ocurren en un medio sin reguladores del crecimiento.

- 5) Trasferir las plántulas a un medio de trasplante hasta cuando alcancen su crecimiento normal.

## Obtención de Monoploides

Kao et al. (1969) fueron los primeros en informar sobre el uso del cultivo de embriones para producir plantas haploides de cebada. Normalmente, cuando se cruza *Hordeum vulgare* con *H. bulbosum*, los cromosomas de esta última especie son eliminados del embrión porque el crecimiento de las células haploides es más lento que el de las diploides; usando en cambio la técnica del cultivo de embriones, es posible aislar haploides y cultivarlos in vitro hasta la madurez, lo que hace posible la obtención de plantas haploides de *H. vulgare*.

### Procedimiento para la producción de monoploides en cebada

Kao et al. (1969) desarrollaron el siguiente procedimiento:

- 1) Exponer las plantas de *H. vulgare* y de *H. bulbosum* a un fotoperíodo de 18 horas ( $84 \times 10^3$  lux) y a temperaturas de  $18^\circ\text{C}$  durante el día y de  $13^\circ\text{C}$  durante la noche. Bajo estas condiciones las flores aparecen aproximadamente al mes y medio, aunque el tiempo de floración puede variar, dependiendo del cultivar usado.
- 2) Emascular las flores de *H. vulgare* 2 ó 3 días antes de la antesis, removiendo las anteras con unas pinzas. Para ello, se corta con unas tijeras el tercio superior de la corola de las flores y al día siguiente se remueven las anteras, después de que hayan emergido a través del corte. Para detectar una posible autopolinización accidental, se debe observar la presencia del endosperma en las semillas, ya que éstas no lo tienen cuando provienen del cruzamiento con *H. bulbosum*.
- 3) A los 2 días después de la emasculación, aplicar el polen de *H. bulbosum* al estigma de las flores de *H. vulgare*.
- 4) Cosechar las espigas 20 a 30 días después de la polinización, y esterilizarlas superficialmente durante 5 minutos con una solución de NaOCl de uso doméstico, al 20%. Enjuagar luego con agua destilada esterilizada.
- 5) Abrir los frutos con una aguja de disección usando una cámara limpia (esterilizada) e instrumentos estériles, y con la ayuda de un microscopio de disección con un aumento de 10X.

- 6) Cultivar el embrión de tal manera que la parte ventral esté en contacto con el medio; el medio de cultivo usado es B5 (Gamborg et al., 1968) solidificado con agar. Los embriones se incuban a 15-25 °C durante 2 semanas en la oscuridad, para evitar la germinación precoz.
- 7) Trasferir los embriones diferenciados a la luz, con un fotoperíodo de 15 h (500-1000 lux). Cuando las plantas se hayan establecido, transferirlas a una fuente de luz de alta intensidad, por ejemplo 40-50 x 10<sup>3</sup> lux.
- 8) Trasplantar las plantas obtenidas a un suelo liviano y cultivarlas bajo un rocío intermitente hasta cuando estén suficientemente vigorosas.

Los monoplóides de cebada se pueden distinguir porque presentan ápices erectos, hojas sin pubescencia y tallos delgados. Los híbridos entre *H. vulgare* y *H. bubosum* generalmente tienen hojas anchas y hojas y tallos pubescentes, y presentan un gran número de rizomas.

## Fertilización de Óvulos in Vitro

El cultivo de embriones y óvulos se ha usado exitosamente en la obtención de híbridos provenientes de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, en los cuales el endosperma no se desarrolla normalmente. La fertilización de óvulos in vitro se ha desarrollado como otra alternativa para realizar cruzamientos y para solucionar los problemas de autoincompatibilidad.

Hay barreras fisiológicas que previenen la fusión de gametos en las especies autoincompatibles; en algunas plantas ocurre la inhibición de la germinación del polen, y también se inhibe el crecimiento del polen dentro del estilo. Los procesos inhibidores que ocurren en el estigma o dentro del estilo se pueden superar con el cultivo de óvulos conjuntamente con los granos de polen en germinación.

El éxito de la fertilización de óvulos in vitro depende de ciertos factores. Tanto la edad del óvulo como la del polen se deben determinar cuidadosamente para detectar los estados de desarrollo apropiados para la germinación del polen in vitro y para la fertilización del óvulo; la composición del medio de cultivo es también importante para lograr una germinación normal del polen y un desarrollo normal del óvulo fertilizado. Las condiciones deben posibilitar una alta frecuencia de semillas viables.

Karta et al. (1962) demostraron por primera vez la fertilización de óvulos cultivados in vitro usando *Papaver somniferum*. Aplicaron a los óvulos en cultivo, no polinizados, granos de polen de la misma especie de planta y

obtuvieron la germinación de los granos de polen con la subsiguiente fertilización de los óvulos; así obtuvieron semillas normales en el mismo medio. Desde entonces, se han polinizado in vitro óvulos de varias especies, por ejemplo, *Dianthus caryophyllus*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Argemone mexicana*, *Eschschlozia californica*, *Petunia violacea*, *Antirrhinum majus* y *Dicranostigma franchetianum* (Rangaswamy, 1977; Kanta et al., 1963; Maheshwari et al., 1964; Zenkteler, 1965; Rangaswamy et al., 1969). Todas estas fertilizaciones fueron efectuadas con especies autocompatibles.

Rangaswamy et al. (1967) demostraron que la polinización de óvulos aislados no era factible para superar la autoincompatibilidad de *Petunia axillaris*; sin embargo, si se polinizaba in vitro la placenta con los óvulos adheridos a ella, se producía la fertilización y el desarrollo normal del embrión y del endosperma. La polinización de los óvulos unidos a la placenta supera algunas de las dificultades que se presentan en el cultivo de embriones; son problemas debidos regularmente a la formación excesiva de callos o a los daños causados al embrión. El empleo de este método permitió superar también la autoincompatibilidad de *Petunia hybrida* (Niimi, 1970; Wagner et al., 1973).

También se ha logrado la hibridación interespecífica e intergenérica en especies incompatibles tales como *Melandrium album* x *M. rubrum* y *M. album* x *Silene schafta* (Zenkteler, 1967, 1970; Zenkteler et al., 1975).

## Embriogénesis Somática a Partir de Nucelas

El cultivo de óvulos tiene otra aplicación en la regeneración de embriones adventicios y de callos embriogénicos a partir de las nucelas de óvulos jóvenes en plantas leñosas. En muchas plantas, particularmente de familias cuyas especies son predominantemente tropicales, las nucelas tienen la capacidad de producir embriones adventicios in vitro; la producción de tales embriones se puede estimular in vitro en éstas y en otras especies, cuya nucela no es normalmente embriogénica.

Por embriogénesis somática, originada directamente en explantes de nucelas o de callos provenientes de plantas leñosas, se ha regenerado un número de tales plantas; la lista incluye especies y cultivares poliembriónicos y monoembriónicos de *Citrus* (Maheshwari et al., 1958; Rangan et al., 1968), y de mango *Mangifera indica* (Litz et al., 1984); y especies monoembriónicas de manzana *Malus domestica* (Eichholtz et al., 1979), de *Ribes rubrum* (Zatyko et al., 1975), y de uva *Vitis vinifera* (Mullins et al., 1976);

también incluye especies de árboles frutales de la familia Myrtaceae que poseen poliembriónía (Litz, 1984b y 1984c).

A partir de óvulos se han inducido embriones somáticos de *Citrus* (Button et al., 1971). También se ha obtenido la embriogénesis somática en cultivos nucelares de ciertas especies de cucurbitáceas, como *Luffa cylindrica* y *Trichosanthes anguina* (Rangaswamy et al., 1975). Los estudios de embriogénesis somática obtenida de óvulos en cultivo y de explantes nucelares han sido objeto de varias revisiones recientes (Button et al., 1977; Spiegel-Roy et al., 1980; Litz et al., 1985).

En muchas plantas leñosas los callos regenerados se deben obtener de embriones o de plántulas, ya que cuando provienen de tejidos maduros pierden la mayor parte de su potencial regenerador de plantas. Teniendo en cuenta el éxito alcanzado con los cultivos nucelares para regenerar especies de plantas leñosas comúnmente difíciles de cultivar in vitro, el cultivo nucelar se puede utilizar para muchas especies de árboles.

### **Obtención de embriones somáticos de la nucela de óvulos de mango**

Litz et al. (1982) y Litz (1984a) desarrollaron el siguiente procedimiento:

- 1) Determinar el estado de desarrollo del embrión cigótico en las plantas monoembriónicas, o del grupo de embriones en los cultivares poliembriónicos. Normalmente, es preferible utilizar óvulos en los que el saco embrionario haya sido llenado por el embrión o los embriones en crecimiento; en el mango, esto ocurre de los 40 a los 60 días después de la polinización, dependiendo del cultivar utilizado.
- 2) Esterilizar la superficie de las frutas inmaduras sumergiéndolas durante 20 a 30 minutos en una solución de 20% a 30% de NaOCl (normalmente usada en labores domésticas). Trabajar en una cámara estéril.
- 3) Remover, bajo condiciones asépticas, los óvulos de las frutas y transferirlos a cajas Petri que contengan el medio de Murashige et al. (1962) modificado. Para preparar este medio, se usa la mitad de las sales mayores, más 60 g/litro de sacarosa, 400 mg/litro de glutamina, 100 mg/litro de ácido ascórbico, 20% (v/v) de AC esterilizada por filtración, y 8 g/litro de agar; se ajusta el pH a 5.7 y se somete el medio al autoclave durante 16 a 20 minutos, a 121 °C y a 1.1 kg/cm<sup>2</sup>.

- 4) Después de 2 a 3 semanas, disectar los óvulos y desechar cuidadosamente el embrión cigótico de los óvulos monoembrionicos o el grupo de embriones de los óvulos poliembriónicos; transferir la nucela a un medio fresco, de la misma formulación anterior, o que contenga de 1 a 2 mg/litro de 2,4-D en lugar del AC. En algunos cultivos poliembriónicos de mango, el embrión cigótico aborta después de la fertilización; en este caso, el grupo de embriones adventicios nucleares se puede usar como un explante.
- 5) A las 3 ó 4 semanas, cuando se hace evidente la formación del callo a partir de la nucela, subcultivar los callos embriogénicos; usar medio líquido con 2,4-D para obtener bastante cantidad de callos.
- 6) Transferir los callos a un medio sin 2,4-D, con el fin de estimular la embriogénesis, como también la maduración y la germinación de los embriones adventicios.

## Referencias

- Alexander, L. J. 1956. Embryo culture of tomato interspecific hybrids. *Phytopathology* 46:6. (Resumen analítico.)
- Ashley, T. 1972. Zigoti shrinkage and subsequent development in some *Hibiscus* hybrids. *Planta* 108:303-317.
- Bajaj, Y. P. S. 1964. Development of ovules of *Abelmoschus esculentus* L. var. *Pusa Sawani* in vitro. *Proc. Natl. Inst. Sci. India* 30B:175-185.
- Beamish, K. I. 1950. Seed failure following hybridization between the hexaploid *Solanum demissum* and four diploid *Solanum* species. *Amer. J. Bot.* 42:297-304.
- Blake, M. A. 1939. Some results of crosses of early ripening varieties of peaches. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 37:232-241.
- Blakeslee, A. F. y Satina, S. 1944. New hybrids from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryos on malt media. *Science* 99:331-334.
- Brink, R. A. y Cooper, D. C. 1941. Incomplete seed failure as a result of somatoplastic sterility. *Genetics* 26:487-505.
- y ———. 1947. The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13:423-541.
- Button, J. y Bornman, C. H. 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange in vitro. *J. S. Afr. Bot.* 37:127-134.

- y Kochba, J. 1977. Tissue culture in the citrus industry. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Alemania. p. 70-92.
- Chopra, R. N. y Sabharwal, P. S. 1963. In vitro culture of ovules of *Gynandropsis gynandra* (L.) Briq. and *Impatiens balsamina* L. En: Maheshwari, P. y Rangaswamy, N. S. (eds.). Plant tissue and organ culture: A symposium of the International Society of Plant Morphology. University of Delhi, Delhi, India. p. 257-264.
- Choudhury, B. 1955. Embryo culture technique; 3: Growth of hybrid embryos *Lycopersicon esculentum peruvianum* in culture medium. Indian Jour. Hort. 12:155-156.
- Cooper, D. C. y Brink, R. A. 1944. Collapse of the seed following the mating of *Hordeum jubatum* x *Secale cereale*. Genetics 29:370-390.
- Danielsson, B. 1950. Embryokulturer av stenfrukttrad. Sver. Pomol. Foren. Arsskr. Stockholm 51:200-206.
- Dieterich, K. 1924. Über kultur von embryonen ausserhalb des samens. Flora 117:379-417.
- Eichholtz D.; Robitaille, H.A. y Hasegawa, P.M. 1979. Adventive embryology in apple. HortScience 14:699-700.
- Emershad, R. L. y Ramming, D. W. 1984. In ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. Thompson seedless. Amer. J. Bot. 71:873-877.
- Esen, A. y Soost, R. K. 1973. Seed development in Citrus with special reference to 2x and 4x crosses. Amer. J. Bot. 60:448-462.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- Hannig, E. 1904. Zür physiologie pflanzlicher embryonen; 1: Über die culture von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. Bot. Ztg. 62:45-80.
- Haynes, F. L. 1954. Potato embryo culture. Amer. Potato J. 31:282-288.
- Johri, B. M. y Sehgal, C. B. 1963. Chemical induction of polyembryony *Anethum graveolens* L. Naturwiss. 50:47-48.
- y —. 1966. Growth responses of ovaries of *Anethum*, *Foeniculum* and *Trachyspermum*. Pytomorphology 16:364-378.
- Joshi, P. C. 1962. In vitro growth of cotton ovules. En: Plant embryology: A symposium. Council of Scientific and Industrial Research, Nueva Delhi, India. p. 199-204.
- y Johri, B. M. 1972. In vitro growth of ovules of *Gossypium hirsutum*. Phytomorphology 22:195-209.

- y Pundir, N. S. 1966. Growth of ovules in the cross *Gossypium arboreum* x *G. hirsutum* in vivo and in vitro. *Indian Cotton Jour.* 20:23-29.
- Karta, K. y Maheshwari, P. 1963. Intraovarian pollination in some Papaveraceae. *Phytomorphology* 13:215-229.
- ; Rangaswamy, N. S. y Maheshwari, P. 1962. Test-tube fertilization in a flowering plant. *Nature* 194:1214-1217.
- Kao, K. N. y Kasha, K. J. 1969. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. En: Nialn, R. A. (ed.). *Barley genetics*. Washington State University Press. v. 2, p. 82-88.
- Kerr, T. y Anderson, D. B. 1944. Osmotic quantities in growing cotton bolls. *Plant Physiol.* 19:338-349.
- Khuspe, S. S.; Hendre, R. R.; Mascarenhas, A. F. y Jagannathan, V. 1980. Utilization of tissue culture to isolate interspecific hybrids in *Carica papaya* L. En: Rao, P. S.; Heble, M. R. y Chádha, M. S. (eds.). *Plant tissue culture, genetic manipulation, and somatic hybridization of plant cells*. Bhabha Atomic Research Committee (BARC), Bombay, India. p. 198-205.
- Konzak, C. F.; Randolph, L. F. y Jensen, N. F. 1951. Embryo culture of barley species hybrids: Cytological studies of *Hordeum sativum* x *Hordeum bulbosum*. *J. Hered.* 42:125-134.
- Laibach, F. 1925. Das Taubwerden von Bastardsamen und die kunstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Zeitschr. Bot.* 17:417-459.
- . 1929. Ectogenesis in plants. *Jour. Hered.* 20: 201-208.
- Lammerts, W.E. 1942. Embryoculture an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seeds. *Am. J. Bot.* 29:166-171.
- Ledingham, G. F. 1946. Cytological and development studies of hybrids between *Medicago sativa* and a diploid form of *Medicago falcata*. *Genetics* 25:1-15.
- Lenz, L. W. 1955. Studies in *Iris* embryo culture; 1: Germination of embryos of the subsection *Hexapogon* Benth. (sect. *Regelia sensu* Dykes). *Aliso* 3:173-182.
- Litz, R. E. 1984a. In vitro somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. *HortScience* 19:715-717.
- . 1984b. In vitro somatic embryogenesis from callus of jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. *HortScience* 19:62-64.
- . 1984c. In vitro responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. *HortScience* 19:720-722.
- y Conover, R. A. 1981. In vitro polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:285-288.

- y —. 1982. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *Plant Sci. Lett.* 26:153-158.
- y —. 1983. High frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. *Ann. Bot.* 51:683-686.
- , Knight, R. J. y Gazit, S. 1982. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica* L. *Plant Cell Rpt.* 1:264-266.
- ; — y —. 1984. In vitro somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. *Scientia Hort.* 22:233-240.
- ; Moore, G. A. y Srinivasan, C. 1985. In vitro systems for propagation and improvement of tropical fruits and palms. *Hort. Rev.* 7.
- Maheshwari, N. 1958. In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. *Science* 127:342.
- y Lal, M. 1961. In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum* L. *Phytomorphology* 11:307-314.
- Maheshwari, P. y Karta, K. 1964. Control of fertilization. En: Linskens, H. F. (ed.). *Pollen physiology and fertilization*. North-Holland Publ., Amsterdam, Holanda. p. 187-193.
- y Rangaswamy, N. S. 1958. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. *Indian J. Hort.* 15:275-282.
- Melnick, V. M.; Holm, L. y Struckmeyer, B. E. 1964. Physiological studies on fruit development by means of ovule transplantation *in vivo*. *Science* 145:609-611.
- Monnier, M. 1978. Culture of zygotic embryos. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Frontiers of plant tissue culture 1978*. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. p. 277-295.
- Moore, G. A. y Litz, R. E. 1984. Biochemical markers for *Carica papaya*, *C. cauliflora* and plants from somatic embryos of their hybrid. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:213-218.
- Mullins, M. G. y Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis in vitro. *J. Exp. Bot.* 27:1022-1030.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Muzik, T. J. 1956. Studies on the development of the embryo and seed of *Hevea brasiliensis* in culture. *Lloydia* 19:86-91.
- Nhmi, Y. 1970. In vitro fertilization in the self-incompatible plant *Petunia hybrida*. *J. Jap. Soc. HortSci.* 39:345-352.

- Nitzsche, W. y Hennig, L. 1976. Fruchtknotenkultur bei Grasern. Z. Pflanzenzucht 77:80-82.
- Norstog, K. 1961. The growth and differentiation of cultured barley embryos. Amer. Jour. Bot. 48:876-884.
- Raghavan, V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Nueva York.
- . 1977. Applied aspects of embryo culture. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Alemania. p. 375-397.
- y Srivastava, P.S. 1982. Embryo culture. En: Johri, B. M. (ed.). Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag, Alemania. p. 195-230.
- Randolph, L. F. 1945. Embryo culture of Iris seed. Bull. Amer. Iris Soc. 97:33-45.
- y Cox, L. G. 1943. Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 43:284-300.
- Rangan, T. 1982. Ovary, ovule, and nucellus culture. En: Johri, B. M. (ed.). Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag, Alemania. p. 105-129.
- ; Murashige, T. y Bitters, W. P. 1968. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. HortScience 3:226-227.
- Rangaswamy, N. S. 1977. Application of in vitro pollination and in vitro fertilization. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Alemania. p. 412-425.
- . 1982. Nucellus as an experimental system in basic and applied tissue culture research. En: Rao, A. N. (ed.). Tissue culture of economically important plants. Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED) and ANBS, Singapur. p. 269-286.
- y Shivanna, K. R. 1967. Induction of gamete compatibility and seed formation in axenic cultures of a diploid self-incompatible species of *Petunia*. Nature 216:937-939.
- y ———. 1969. Test-tube fertilization *Dicranostigma franchetianum* (Prain) Fedde. Current Sci. 38:257-259.
- y ———. 1975. Nucellus culture of two cucurbits *Luffa cylindrica* and *Trichosanthes anguina*. Ann. Bot. 39:193-196.
- Renner, O. 1914. Befruchtung und Embryobildung bei *Oenothera lamarckiana* und einigen verwandten Arten. Flora 107:115-150.

- Rietsema, J.; Satina, S. y Blakeslee, A. F. 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos in vitro. Amer. J. Bot. 40:538-545.
- Sachar, R. C. y Kapoor, M. 1959. In vitro culture of ovules of *Zephyranthes*. Phytomorphology 9:147-156.
- Satina, S.; Rappaport, J. y Blakeslee, A. F. 1950. Ovular tumours connected with incompatible crosses in *Datura*. Am. J. Bot. 37:576-586.
- Smith, P. G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 44:413-416.
- Spiegel-Roy, P. y Kochba, J. 1980. Embryogenesis in *Citrus* tissue cultures. En: Fiechter, A. (ed.). Advances in biochemical engineering, plant and cell cultures. Springer-Verlag, Alemania. p. 27-48.
- Tukey, H. B. 1944. The excised-embryo method of testing the germinability of fruit seed with particular reference to peach seed. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 45:211-219.
- van Overbeek, J. 1941. Hormonal control of embryo and seedling: Cold in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science 94:350-351.
- Wagner, G. y Hess, D. 1972. In vitro-Befruchtungen bei *Petunia hybrida*. Z. Pflanzenphysiol. 69:262-269.
- Wakisuka, T. y Nakajima, T. 1974. Effect of cultural conditions on the in vitro development of ovules in *Petunia* hybrids. Vilm. Jpn. J. Breed. 24:182-187.
- Withner, C. L. 1942. Nutrition experiments with orchid seedlings. Bull. Orchid Soc. 1:112-114.
- Yeung, E. C.; Thorpe, T. A. y Jensen, C. J. 1981. In vitro fertilization and embryo culture. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 253-271.
- Zatyko, J. M.; Simon, I. y Szabo, C. S. 1975. Induction of polyembryony in cultivated ovules of red currant. Plant Sci. Lett. 4:281-283.
- Zentkeler, M. 1965. Test-tube fertilization in *Dianthus caryophyllus* Linn. Naturwissenschaften 23:645-646.
- . 1967. Test-tube fertilization in ovules in *Melandrium album* Mill. with pollen grains of several species of the *Caryophyllaceae* family. Experientia 23:775.
- . 1970. Test-tube fertilization of ovules in *Melandrium album* Mill. with pollen grains of *Datura stramonium*. Experientia 26:661-662.
- ; Misiura, E. y Guzowska, I. 1975. Studies in obtaining hybrid embryos in test tubes. En: Johri, B. M. Form, structure and function in plants. Meerut, Sarita Prakashan, India. p. 180-187.