

SELECCION Y CARACTERIZACION DE UNA LINEA CELULAR DE LIMONERO TOLERANTE A ESTRES SALINO

A. Piqueras y E. Hellin

*Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
Avda. de la Fama, 1. Apto. 4195. 30080, Murcia. España.*

RESUMEN

Se han seleccionado líneas de callos embriogénicos de *Citrus limonum*, R. tolerantes a varias concentraciones de NaCl caracterizándose la correspondiente a 10 g L^{-1} de NaCl y comprobándose la estabilidad de este carácter. La línea control y tolerante mostraron diferencias en sus curvas de crecimiento y niveles de tolerancia, siendo 10 g L^{-1} completamente inhibitorio para las células no seleccionadas. Se ha comprobado que el ácido giberélico y el empleo de glicerol estimulan la producción de embriones somáticos. Fueron regenerados embriones de ambas líneas celulares que dieron plántulas de morfología característica y diferenciada entre la línea tolerante y la no seleccionada.

Palabras clave: Tolerancia a salinidad. Citrus. Cultivo de tejidos.

SUMMARY

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF A NaCl-TOLERANT CELL LINE OF CITRUS LIMONUM

Citrus limonum R. embryogenic callus were selected for their tolerance to several levels of NaCl and the most tolerant one was characterized (10 g L^{-1}) and the stability of this character proved. Unselected and tolerant callus lines showed marked differences in their growth curves and tolerance. The maximum level of tolerance achieved was completely inhibiting to the unselected line. The addition of gibberellic acid and glycerol enhanced embryogenesis in both lines. Somatic embryos were recovered and plantlets regenerated from selected embryos showed an altered morphology when compared with plantlets from the unselected callus line.

Key words: Salt-tolerance. Citrus. Cell culture.

INTRODUCCION

En los últimos años, se han seleccionado líneas celulares a partir de células somáticas cultivadas con diferentes tipos de tolerancia frente a distintos estreses nutricionales y ambientales (Chandler y Thorpe, 1986;

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT en el Plan Nacional de Biotecnología.

Dix, 1988). En algunos casos estos trabajos han permitido la regeneración de plantas tolerantes a estrés salino (Nabors *et al.*, 1980; McCoy, 1987; Ben-Hayyim y Goffer, 1989). Por otra parte, los cultivos tolerantes a salinidad han sido empleados frecuentemente para estudiar los mecanismos bioquímicos y fisiológicos a nivel celular de tolerancia a salinidad.

En relación con estrés producido por salinidad, los cítricos se encuentran entre las especies más sensibles de frutales (Maas y Hoffman, 1977). Una aproximación para solucionar este problema ha sido la selección

de líneas celulares de varias especies de cítricos (*C. sinensis* y *C. aurantium*) tolerantes a salinidad (Ben-Hayyim y Kochba, 1982). Los anteriores resultados permiten abordar con interés la selección de variedades de cítricos adaptadas a zonas irrigadas con aguas salinizadas como en el caso de la Región de Murcia.

El objetivo de este trabajo es la caracterización de una línea de callo embriogénico tolerante a estrés salino de *C. Limonum* de forma estable, el estudio de las condiciones óptimas de embriogénesis en situaciones de estrés y la regeneración de plántulas de ambas líneas.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos celulares

Los callos embriogénicos fueron iniciados a partir de nucelas procedentes de frutos inmaduros (de 4 a 8 semanas tras la antesis) de limonero (*C. limonum* R. var Verna). Los tejidos nucelares fueron extraídos en condiciones de esterilidad e inoculados en el medio de cultivo descrito por Murashige y Tucker, (1969). Los tejidos formaron callos embriogénicos en cuatro semanas, a partir de este momento los callos fueron subcultivados cada cuatro semanas durante seis meses antes de iniciar el proceso de selección para tolerancia a salinidad.

Selección para tolerancia a salinidad

Las experiencias de tolerancia a salinidad se dividieron en dos partes, una primera en la que se utilizaron cuatro concentraciones de NaCl (5, 7.5, 10 y 12.5 g L⁻¹), inoculándose

1000 callos de unos 5 mg en medio de cultivo base solidificado con agar (0.8 %). Tras una exposición de seis semanas, se efectuó un recuento de los callos supervivientes en cada nivel obteniéndose el nivel de tolerancia inicial. Los callos tolerantes a cada nivel, se subcultivaron en sus niveles respectivos de NaCl durante un periodo de 18 meses antes de realizarse la segunda parte de la experiencia. En esta segunda parte se realizaron en medio líquido las curvas de crecimiento en peso seco y fresco para cada línea tolerante y el control, estimándose la tolerancia relativa de las líneas no seleccionadas. Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces Erhlemeyer con 60 ml de medio (Murashige y Tucker, 1969) líquido, con 50 mg de callo por matraz y mantenidos en agitación a 130 rpm durante 50 días.

Para la obtención de embriones somáticos se probaron dos fuentes de carbono (sacarosa 50 g L^{-1} y glicerol 2 %) y varios reguladores del crecimiento (ácido giberélico (1 mg L^{-1}), bencilaminopurina (1 mg L^{-1}) y una combinación de ambos), en callos tolerantes y no seleccionados. La regeneración de plantas se realizó en medio base solidificado con agar (10 g L^{-1}) y 3 % de sacarosa como fuente

de carbono, regenerándose 50 plántulas de cada línea.

Las determinaciones de peso fresco se hicieron filtrando los cultivos líquidos, con un filtro Whatman N.º 1 a intervalos de 10 días durante 50 días. Las medidas de peso seco se determinaron, después de secar los tejidos en una estufa a 80°C durante 24 h. Todas las experiencias se realizaron por duplicado.

RESULTADOS

Resistencia de los callos embriogénicos de C. limonum a varias concentraciones de ClNa

Los callos embriogénicos expuestos a salinidad, mostraron una sensibilidad creciente para cada nivel de

NaCl con los porcentajes de supervivencia que se muestran en la figura 1; los niveles inferiores de NaCl resultaron en alguna medida soportables, por el contrario, los dos niveles superiores (10 y 12.5 g L^{-1} de NaCl) resultaron letales para el 95 % de los

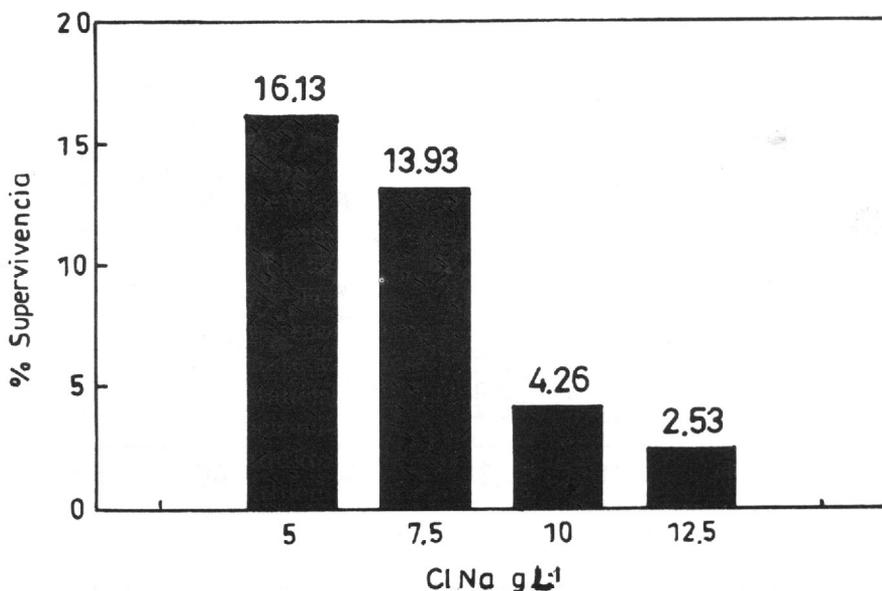


FIG. 1.—Tolerancia de los callos embriogénicos de *C. limonum* a varios niveles de NaCl.

cultivos. Consideramos que este resultado puede ser atribuido a la presencia en el cultivo inicial de una

muy reducida población de células tolerantes.

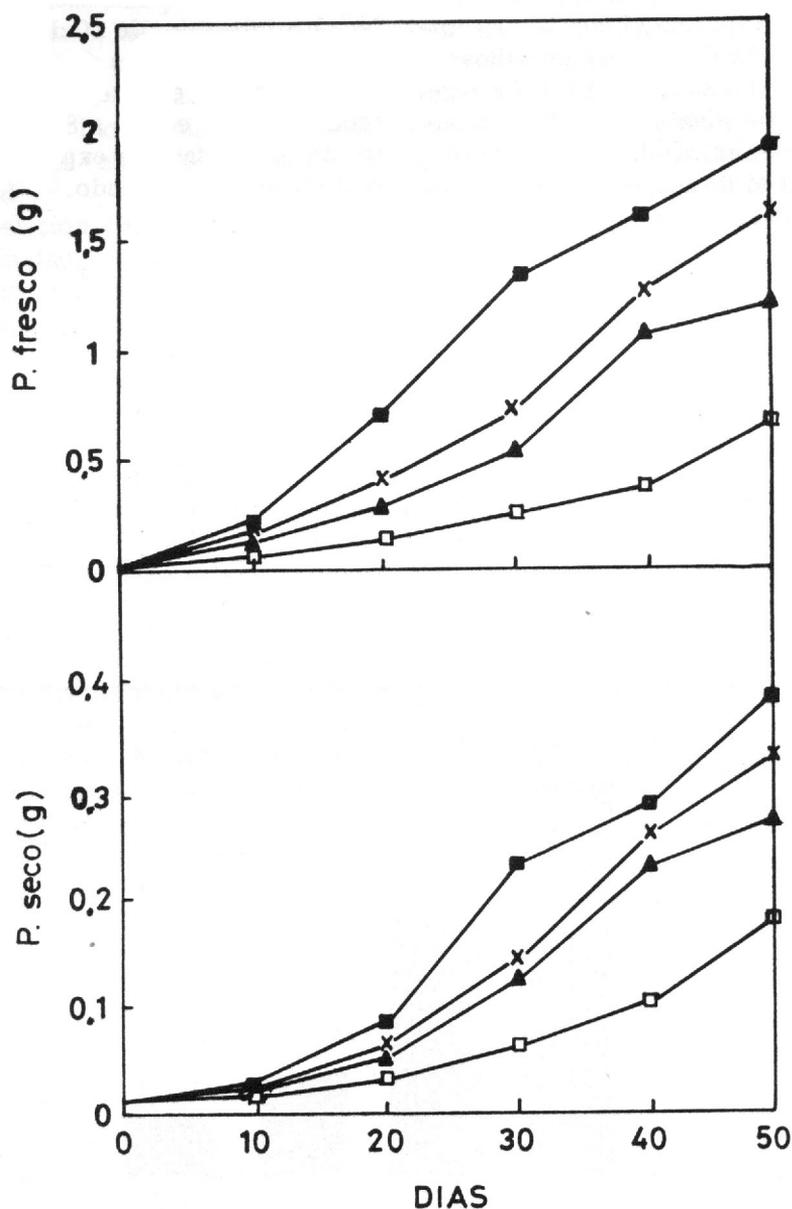


FIG. 2.—Curvas de crecimiento (A. incremento de peso fresco y B. incremento de peso seco) de callos embriogénicos de *C. limonum* seleccionados frente a varios niveles de NaCl (■ 0, × 5, ▲ 7.5 y □ 10 g L⁻¹ NaCl).

Selección y caracterización de callos tolerantes a salinidad

La figura 2 presenta las curvas de crecimiento de diversas líneas de callos embriogénicos tolerantes a NaCl (0, 5, 7.5, 10 g L⁻¹), expresado como incremento de peso fresco y seco. La curva de crecimiento de las células no seleccionadas se caracteriza, por una fase lag de 7 días con un rápido incremento en peso fresco. Las células alcanzan la fase estacionaria en unos 50 días, con un incremento en peso fresco de unas 40 veces el del inóculo inicial. El resto de las líneas celulares aumenta progresivamente su fase lag, hasta alcanzar los 15 días de la línea seleccionada a 10 g L⁻¹ de NaCl y ofrece rendimientos en peso fresco final decrecientes. La tendencia de los pesos secos de las diferentes

líneas, es semejante a la del peso fresco y la relación peso seco/peso fresco se mantiene constante para todas las líneas entre el 20 y 22 %.

Cuando las células no seleccionadas fueron cultivadas en medio con 10 g L⁻¹ de NaCl (Fig. 3), no tuvieron incrementos significativos en su peso fresco. En este mismo nivel de NaCl, las células seleccionadas a 10 g L⁻¹ multiplicaron su peso fresco por 15, lo que supone el 37.5 % del aumento de las células no seleccionadas en su medio original.

Exponiendo las células no seleccionadas y tolerantes a 10 g L⁻¹ a varios niveles de NaCl (Fig. 4), se pudo comprobar que ambas líneas crecen de la misma forma en ausencia de NaCl (unas 40 veces el peso inicial). En todas las concentraciones de NaCl probadas hasta 15 g L⁻¹, las

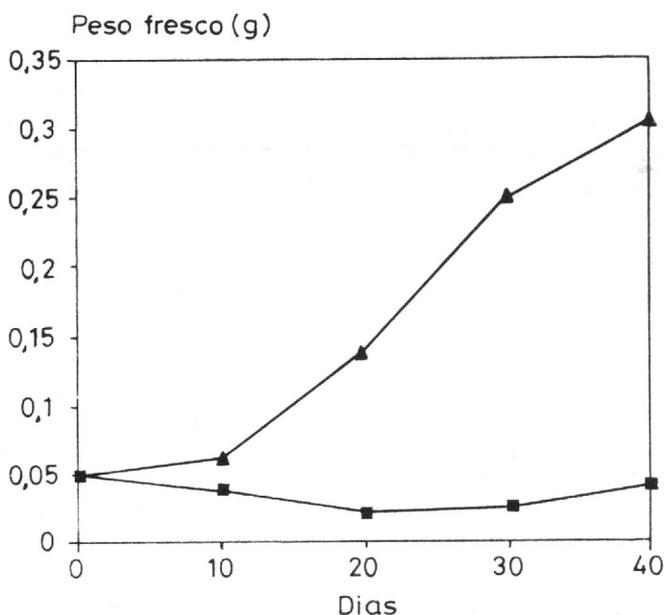


FIG. 3.—Curvas de crecimiento de células no seleccionadas (■) y seleccionadas (▲) expuestas a 10 g L⁻¹ de NaCl.

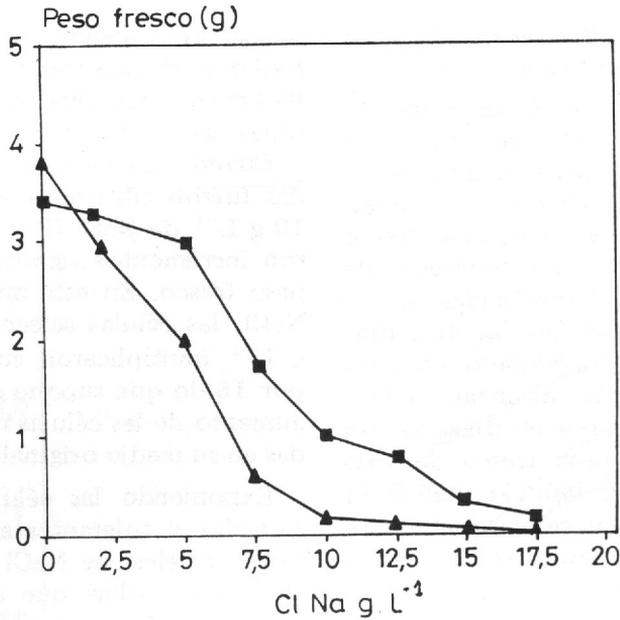


FIG. 4.—Respuestas de la línea no seleccionada (▲) y tolerante a 10 g L^{-1} (■) ferente a varios niveles de NaCl.

células tolerantes superaron a las no seleccionadas que vieron inhibido su crecimiento a 10 g L^{-1} de NaCl.

Estabilidad de la tolerancia a NaCl

Para comprobar la estabilidad de su tolerancia, callos tolerantes a 10

g L^{-1} de NaCl tras 12 subcultivos en medio con sal, fueron transferidos a medio sin NaCl durante seis subcultivos y a continuación expuestos nuevamente a 10 g L^{-1} de NaCl. En la Tabla 1 se observa como el incremento de las células tolerantes mantenidas previamente en medio sin sal,

TABLA 1

Estabilidad de la tolerancia a NaCl en células de *C. limonum* adaptadas a medio con NaCl (10 g L^{-1}).

	p. f. inicial.	p. f. final
Células tolerantes	0.100	0.900
Células tolerantes*	0.100	0.750
Células control (10 g L^{-1} NaCl)	0.100	0.110

*.—Tras cinco meses sin sal cultivadas en medio NaCl (10 g L^{-1}).
p. f. peso fresco en gramos.

es siete veces el de las células no seleccionadas cuando ambas son expuestas nuevamente a 10 g L^{-1} de NaCl. Este resultado confirma la estabilidad de la tolerancia a NaCl, conseguida durante el proceso de selección.

Efecto de varios reguladores del crecimiento y fuentes de carbono, sobre la embriogénesis somática en callos no seleccionados y tolerantes a NaCl

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de proliferación respecto del control, de los callos sensibles no

seleccionados y tolerantes a 10 y 12.5 g L^{-1} de NaCl. En los tejidos sensibles se observa un efecto positivo del ácido giberélico, que alcanza casi el 95 % del control con niveles casi idénticos para el tratamiento control y para las combinaciones de GA_3 y BAP, resultando éste último claramente inhibitorio. En los callos tolerantes el medio control tiene un efecto claramente positivo, superando a los medios suplementados con reguladores del crecimiento (95 y 85 %). Se puede destacar la escasa proliferación de los tejidos tolerantes a 12.5 g L^{-1} .

TABLA 2

Efecto de los reguladores del crecimiento, GA_3 (1 mg L^{-1}) y BAP (1 mg L^{-1}) sobre la proliferación de callos tolerantes y sensibles a salinidad. (% del control).

	Control	GA_3	$\text{GA}_3 + \text{BAP}$	BAP
Sensible	90	95	60	50
Tol. NaCl 10 g L^{-1}	95	85	30	30
Tol. NaCl 12.5 g L^{-1}	85	50	12.5	10

Además del efecto de la proliferación, también se ha estudiado la influencia de los diferentes reguladores del crecimiento aplicados sobre el proceso de embriogénesis, a fin de obtener un protocolo de regeneración más eficiente para cada tipo de tejido.

En esta experiencia se consideraron como embriogénicos, todos aquellos callos que presentaban un mínimo de cuatro embriones somáticos en estadio globular a corazón, siendo empleados para establecer el

porcentaje de embriogénesis inducida por cada tratamiento.

La Tabla 3 ofrece la respuesta embriogénica de cada tratamiento. En los tejidos sensibles resultó más efectivo el tratamiento con GA (32.5 %), sin que los otros tratamientos mostraran respuestas apreciables. Los tejidos tolerantes a 10 g L^{-1} de NaCl ofrecieron una respuesta similar a los tejidos sensibles en el tratamiento con GA, siendo cuantitativamente menor en un 50%. También se observó un efecto posi-

TABLA 3

Efecto de los reguladores del crecimiento GA₃ (1 mg L⁻¹) y BAP (1 mg L⁻¹) sobre la embriogénesis somática en callos sensibles y tolerantes a NaCl (10 g L⁻¹). (% del control).

	Control	GA	GA ₃ + BAP	BAP
Sensible	—	32.5 %	—	—
Tol. NaCl (10 g L ⁻¹)	5 %	17.5 %	—	—
Tol. NaCl (12.5 g L ⁻¹)	15 %	20.0 %	—	—

tivo en el medio control, aunque de mucha menor intensidad en la respuesta (5 %). Los tejidos tolerantes a 12.5 g L⁻¹ presentan un porcentaje de embriogénesis inducida bastante similar para el tratamiento control y el de GA y superando en ambos tratamientos a los callos tolerantes a 10 g L⁻¹ de NaCl.

El efecto que tiene la aplicación como fuente de carbono del glicerol, al proceso de embriogénesis somática en callos tolerantes y sensibles

en presencia y ausencia de NaCl (10 g L⁻¹) se presenta en las Tablas 4 y 5.

El proceso de embriogénesis se ve reducido en las células sensibles (3.8 %) junto con una marcada inhibición de la proliferación, debido al efecto tóxico del NaCl. Estos resultados nos hacen considerar el glicerol, como la fuente de carbono más adecuada para regenerar plantas, a partir de callos embriogénicos de Citrus.

TABLA 4

Efecto de distintas fuentes de carbono (glicerol y sacarosa) sobre la embriogénesis somática en células tolerantes y sensibles de C. Limonum en medio control y NaCl (10 g L⁻¹). (% embriogénesis).

	Glicerol (2 %)	
	Control	NaCl (10 g L ⁻¹)
Tolerantes (NaCl 10 g L ⁻¹)	72.72	42.62
Sensibles	63.72	3.80
	Sacarosa (5 %)	
	Control	NaCl (10 g L ⁻¹)
Tolerantes	10.12	8.60
Sensibles	30.25	4.30

Regeneración de plántulas a partir de callos no seleccionados y tolerantes

Los tratamientos anteriores nos han permitido obtener embriones tanto de las líneas no seleccionadas como tolerantes; los de estas últimas en presencia de NaCl. Estos embriones somáticos han sido germinados

y desarrollados hasta formar plántulas completas. Las plántulas procedentes de líneas tolerantes se caracterizaron en su mayor parte por no presentar entrenudos y tener aspecto de roseta en la disposición de sus hojas, comparadas con las plántulas procedentes de células no seleccionadas (Tabla 5).

TABLA 5

Morfología de las plántulas regeneradas de Citrus limonum a partir de callos control y tolerantes.

Forma	Línea tolerante	Línea no seleccionada
Roseta	95 %	—
Normal	5 %	100 %

Datos expresados en % sobre 50 plántulas regeneradas de cada línea.

DISCUSION

Los resultados que hemos presentado, confirman la selección de una línea de callos embriogénicos de *C. limonum* tolerante a 10 g L^{-1} de NaCl. Células con características semejantes han sido obtenidas en otras especies de cítricos, como *C. sinensis* y *C. aurantium* (Kochba *et al.*, 1982), aunque de procedencia ligeramente diferente, en nuestro caso nucelar y en las otras especies ovular. Aunque en la mayor parte de las características los callos tolerantes de *C. limonum* coinciden con las otras especies de cítricos, la resistencia inicial obtenida resultó ser mayor que en la experiencia de Kochba *et al.*, (1982), probablemente por haber

estado los callos sometidos a un periodo prolongado de cultivo in vitro antes de comenzar la selección, lo que pudo generar un proceso de variación somaclonal en las células cultivadas. También resulta significativa, la menor tolerancia de nuestras células comparada con las de *C. sinensis* y *aurantium*, ya que su incremento de peso fresco en medio con 10 g L^{-1} de NaCl, es un 10 % menor (Ben-Hayyim y Kochba, 1982). Sin embargo, las diferencias más notables se producen cuando se comparan con líneas celulares de tabaco adaptadas o no a salinidad, que resultan mucho más tolerantes pudiendo soportar hasta 25 g L^{-1} de NaCl;

también el proceso de adaptación sucede más rápidamente, ya que células no seleccionadas de tabaco pueden adaptarse y sobrevivir a salinidad prolongando su fase lag (Hasegawa y Bressan, 1980). Esto puede deberse a la mayor sensibilidad de los cítricos a la salinidad (Furr *et al.*, 1963).

Las células seleccionadas pueden crecer en presencia o ausencia de NaCl, sin mostrar un comportamiento halófito de forma contraria a lo observado en células de *Medicago sativa* (Crougham *et al.*, 1978), *Cicer arietium* (Pandey y Ganapathy, 1984), *Ipomoea batatas* (Salgado-Garciglia, 1985) y *Licopersicon peruvianum* (Hassan y Wilkins, 1988) que mostraron un comportamiento halófito tras el proceso de adaptación.

Al igual que en las otras especies de cítricos, los callos seleccionados de *C. Limonum* mantienen su tolerancia de forma estable. Este hecho nos hace considerar a la línea seleccionada, como homogénea respecto de la tolerancia a salinidad. Si asumimos que las células que la integran puedan ser una mezcla de células tolerantes y sensibles, tras un periodo de cultivo en ausencia de estrés salino, se debería producir un aumento en la proporción de células sensibles. Esto generaría un resultado opuesto al obtenido por nosotros. La estabilidad de la tolerancia también se ha obtenido en células de *Capsicum annum* (Dix y Street, 1975), *Pennisetum americanum* (rangan y Vasil, 1983), *Ipomoea batatas* (Salgado-Garciglia, 1985),

Medicago sativa (McCoy, 1987), *Solanum tuberosum* (Sabbah y Tal, 1990), pero no en células de *Nicotiana tabacum* (Hasegawa y Bressan, 1980). Este carácter permanente o no de la tolerancia, puede ser empleado para diferenciar una variación genética o epigenética de una simple adaptación (Ben-Hayyim y Kochba, 1983; Wataad *et al.*, 1985). En nuestro caso la permanencia del carácter de tolerancia estable nos permite considerar a la línea seleccionada de *C. limonum*, como consecuencia de un proceso de variación en las células del cultivo inicial dentro de una población minoritaria de células potencialmente tolerantes.

Entre los factores que influyen favorablemente en el proceso de diferenciación y germinación de embriones, destacan la presencia de ácido giberélico y el glicerol como fuente de carbono para callos seleccionados, que formaron embriones verdes en ausencia o expuestos a NaCl y posteriormente regeneraron plantas de morfología característica. Estos datos coinciden con las observaciones de Ben-Hayyim y Goffer (1989) en *C. sinensis*, aunque nuestros embriones pudieron formar raíces en ausencia de NAA y requerían pretratamiento con kinetina. La morfología alterada de las plantas regeneradas de células tolerantes, puede deberse a cambios en los niveles endógenos de fitoreguladores producidos por NaCl como incremento en ABA, que pueda inhibir el proceso de diferenciación de brotes.

CONCLUSIONES

Se ha seleccionado una línea celular embriogénica de limonero (*Citrus limonum*, R) estable en su tolerancia a estrés salino (10 g L⁻¹ NaCl).

Se ha comprobado que la presencia en el medio de GA₃ y glicerol

favorecen la embriogénesis, tanto en células control como en tolerantes.

Se han regenerado plántulas a partir, tanto de células sensibles como tolerantes, aunque con diferente morfología.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto de Fomento de la Región de Murcia, la

Beca concedida a D. Abel Piqueras Castillo.

BIBLIOGRAFIA

- BEN-HAYYIM, G. and GOFFER, Y., 1989. Plantlet regeneration from a NaCl-selected salt tolerant callus culture of Shamounti orange (*Citrus sinensis*) L. Osbeck. *Plant Cell Rep.*, 7: 680-684.
- BEN-HAYYIM, G. and KOCHBA, J., 1982. Growth characteristics and stability of tolerance of Citrus callus cells subjected to NaCl stress. *Plant Sci. Lett.*, 27: 87-94.
- BEN-HAYYIM, G. and KOCHBA, J., 1983. Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol.*, 72: 685-690.
- CHANDLER, S. F. and THORPE, T. A., 1986. Variation from plant tissue cultures: Biotechnological applications to improving salinity tolerance. *Biotech, Adv.*, 4: 117-135.
- CROUGHAN, T. P., STAVARECK, S. J. and RAINS, D. W., 1978. Selection of a NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. *Crop. Sci.*, 18: 959-963.
- DIX, P. J., 1988. In vitro approaches to study salt and mineral stresses, and possible breeding applications. In: *Nutrición mineral de las plantas*, Ed. By ICE. Univ. Granada, 7-21.
- DIX, P. J. and STREET, H. E., 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annuum*. *Plant Sci. Lett.*, 5: 231-237.
- FURR, J. R., CARPENTER, J. B. and HEWITT, A. A., 1963. Breeding new varieties of Citrus fruits and rootstocks for the southwest. *J. Rio Grande Vall. Hort. Soc.*, 17: 90-107.
- HASEGAWA, P. M. and BRESSAN, R. A., 1980. Growth characteristics of NaCl-selected and nonselected cells of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol.*, 21: 1437-1355.
- HASSAN, N. S. and WILKINS, D. A., 1988. In vitro selection for salt tolerant lines in *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Cell Rep.*, 7: 463-466.
- KOCHBA, J., BEN-HAYYIM, G., SPIEGEL-ROY, P., SAAD, S. and NEUMAN, H., 1982. Selection of a stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 106: 111-118.

- MAAS, E. V. and HOFFMAN, G. J., 1977. Crop salt tolerance current assesment. J. Irrig. Drain. Div. ASCE 103 (IR2): 115-134.
- McCOY, T. J., 1987. Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants regenerated from NaCl tolerant cell lines. *Plant Cell Rep.*, 6: 417-422.
- MURASHIGE, T. and TUCKER, D. P. H., 1969. Growth factor requirements of Citrus tissue culture. In: *Proceeding 1st. Int. Citrus Symposia*, Chapman, H. (Ed.): University of California, 1155-1161.
- NABORS, M. W., GIBBS, S. E., BERSTEIN, C. S. and MEIS, M. E., 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, 97: 13-17.
- PANDEY, R. and GANAPATHY, P. S., 1984. Effects of sodium chloride stress on callus cultures of *Cicer Arietinum* L. cv. BG-203: growth and ion accumulation. *J. Exper. Bot.*, 35: 1194-1199.
- RANGAN, T. S. and VASIL, I. K., 1983. Sodium chloride tolerant embryogenic cell lines of *Penisetum americanum*. *Ann. Bot.*, 52: 59-64.
- SABBAH, S. and TAL, M., 1990. Development of callus and suspension cultures of potato resistant to ClNa and mannitol and their response to stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 21: 119-128.
- SALGADO-GARCIGLIA, R., 1985. NaCl-resistant variant cells isolated from sweet potato cell suspensions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 5: 3-12.
- WATAAD, A. A., LERNER, H. R. and REINHOLD, L. 1985. Stability of the salt-resistance character in *Nicotiana* cell lines to grow in high NaCl concentration. *Physiol. Veget.*, 23: 887-894.

Recibido: 2-3-92.
Aceptado: 10-7-92.