

## GERMINACIÓN IN VITRO DE EMBRIONES INMADUROS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE ESTRATIFICACIÓN

M.E. Daorden\*, J.A. Marín, A. Arbeloa

Estación Experimental de Aula Dei, Apartado 202, 50080  
Zaragoza, España

\* Dirección permanente: EEA San Pedro- INTA, C.C. Nº 43,  
2930 Buenos Aires, Argentina

### RESUMEN

En los programas de mejora de especies frutales adquiere gran importancia la reducción del tiempo para la obtención de una nueva generación. La estratificación y germinación in vitro de los embriones inmaduros permite mejorar tanto el porcentaje de su germinación como acortar el tiempo necesario para el desarrollo de la nueva plántula. Asimismo, el cultivo in vitro de embriones permite superar con éxito la falta de viabilidad de las semillas procedentes de cruzamientos.

En este trabajo se comparan dos temperaturas de estratificación in vitro (0° y 4 °C), en relación al desarrollo de embriones provenientes de cruzamientos interespecíficos entre ciruelo y albaricoquero. Del mismo modo, se estudia la influencia del tamaño del embrión con el fin de optimizar el proceso de obtención de plantas en un programa de mejora.

Los datos presentados aquí muestran que la germinación in vitro de embriones inmaduros, se ha realizado con éxito (más del 91%) cuando la estratificación se realizó a 4 °C. Durante la estratificación, tanto el peso de los embriones, como su incremento de peso a los 30 y 60 días después de la siembra, fueron considerados indicadores de su evolución. Se ha observado una gran influencia de la temperatura en el peso e incremento de peso observado a los 60 días después de la siembra. Una influencia menor se observó según el tamaño de siembra del embrión. El cultivo de embriones y la estratificación a 4 °C permitió una adecuada germinación de semillas inmaduras procedentes de cruzamientos de programas de mejora.

**Palabras clave:** Estratificación in vitro, Semillas, Germinación, *Prunus*, Híbridos interespecíficos.

### SUMMARY

#### IN VITRO GERMINATION OF IMMATURE EMBRYOS AT DIFFERENT STRATIFICATION TEMPERATURES

Rapid obtaining of clonal plants is desirable to shorten crossing programs on fruit tree breeding. In vitro stratification and germination allowed us to shorten time and to improve germination rates by embryo rescue.

In this work two stratification temperatures (0° and 4 °C) were compared related to development of interspecific hybrid embryos. Embryo size influence was also determined in order to optimise the process.

Data showed that germination took place in 91% of the seeds when the stratification temperature was 4 °C. During stratification, embryo weight and embryo-weight increment were assessed at 30 and 60 days after sowing. Stratification temperature showed a significant effect in both embryo weight and embryo-weight increment 60 days after sowing, while embryo size showed a smaller influence. Embryo culture and stratification at 4 °C allowed a satisfactory germination of immature seeds originated in crosses from breeding programs.

**Key words:** In vitro stratification, Seeds, Germination, *Prunus*, Interspecific hybrids.

## Introducción

El cultivo in vitro de embriones de especies de *Prunus* ha sido utilizado con éxito en programas de mejora, con el fin de superar la falta de viabilidad de las semillas obtenidas en ciertos cruzamientos. BLAKE (1939) fue el primero en aplicar la técnica en un programa de mejora de melocotón; más recientemente ha sido ampliamente usada en la obtención de variedades tempranas de la misma especie cuyos embriones no están formados correctamente y no se desarrollan adecuadamente (RAMMING, 1985). Del mismo modo se ha empleado en la mejora de variedades de uva sin semillas (EMERSHAD y RAMMING, 1982). Además, la existencia de barreras de incompatibilidad postzigótica puede originar la pérdida de los embriones resultantes de hibridaciones interespecíficas o intraespecíficas. Esta limitación puede superarse mediante el rescate de estos embriones en medios de cultivo adecuados (RAMMING, 1990).

Por otra parte, en los programas de mejora de especies frutales adquiere gran importancia la reducción del tiempo necesario para la obtención de una nueva generación, y en este sentido la estratificación in vitro de los embriones inmaduros ha permitido mejorar tanto el porcentaje de su germinación como acortar el tiempo necesario para el desarrollo de la nueva plántula (ARBELOA *et al.*, 2000; GARCÍA *et al.*, 2001; DAORDEN *et al.*, 2001a). Sin embargo, la

temperatura de estratificación utilizada, ha sido diferente según la especie y las condiciones del trabajo, ya que el frío es necesario para interrumpir el reposo de las semillas e inducir el alargamiento de entrenudos en el tallo (HARTMANN *et al.*, 1990; HERRERO, 1978). Estudiar la temperatura más adecuada para cada material es del todo necesario para una adecuada germinación de las semillas.

En el cultivo in vitro de embriones inmaduros, el tamaño inicial del embrión ha mostrado tener una gran influencia en el resultado del cultivo, creciendo la dificultad a medida que el tamaño disminuye (BURGOS y LEBDETER, 1993). El estudio del comportamiento de embriones de diferente tamaño cobra una gran importancia para optimizar las condiciones de germinación in vitro de los embriones.

En este trabajo se comparan dos temperaturas de estratificación in vitro, en relación al desarrollo de embriones provenientes de cruzamientos interespecíficos entre ciruelo y albaricoquero. Del mismo modo, se estudia la influencia del tamaño del embrión con el fin de optimizar el proceso de obtención de plantas en un programa de mejora.

## Materiales y métodos

Tres clones de ciruelo Mirobolán (*Prunus cerasifera* Ehrh) (Mb), cultivados en la

colección de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza), fueron utilizados como parentales femeninos. Como parental masculino se utilizó un clon de albaricoquero de la variedad 'Moniquí' (*Prunus armeniaca* L) (MB). Los cruzamientos se llevaron a cabo polinizando manualmente flores emasculadas de ramas marcadas. La cosecha de frutos inmaduros se llevó a cabo 12 semanas después de la polinización.

Utilizando procedimientos asépticos se extrajeron las semillas y se disectaron los embriones eliminando los tegumentos. Cada embrión fue pesado y medido. Se sembraron en tubos de vidrio con tapones de polipropileno con 10 ml de medio de cultivo (CHEÉ y POOL, 1987) sin reguladores de crecimiento y se envolvieron en papel de aluminio para evitar la exposición a la luz. Se colocaron en dos temperaturas de estratificación, a 4 °C (28 embriones) y a 0 °C (27 embriones) manteniendo la oscuridad durante toda la estratificación.

Durante el período de estratificación se determinó, en condiciones asépticas, el peso de los embriones a los 30 y 60 días de su siembra in vitro. Después de 18 semanas de estratificación, el material se pasó a la cámara de cultivo a 23 °C en oscuridad durante unos días, para posteriormente exponerlo a la luz. Se evaluó el porcentaje y el momento de la germinación, considerando embriones germinados aquellos que poseían una radícula y un brote de por lo menos 5 mm cada uno.

Se analizaron la influencia de la temperatura de estratificación y del tamaño del embrión en el momento de su siembra in vitro, tanto en el peso, como en el incremento de peso del embrión a lo largo del período de estratificación. Los datos fueron analizados mediante los correspondientes análisis de varianza, y se efectuaron contrastes en los casos donde se halló interacción entre ambas fuentes de variación. Se utilizó el programa estadístico SPSS (Noursis, M.S.J; 1999. Statistical Package for the Social Sciences /Pc for the IBM PC / XT/ AT. SPSS Inc., Chicago, IL.).

## Resultados

### Tamaño de embriones

Se sembraron un total de 55 embriones, que mostraron diferencias de tamaño según los cruzamientos efectuados (cuadro 1). El mayor porcentaje (74,5%) correspondió a tamaños comprendidos entre 8-10 mm, mientras que un 25,5% correspondió a tamaños inferiores. Entre estos últimos, un 7,3% correspondió a embriones de un tamaño inferior a 3,5 mm perteneciendo todos ellos al cruzamiento Mb1 x MB. En todos los cruzamientos el mayor porcentaje correspondió a embriones de tamaño superior a 8 mm.

Cuadro 1. Porcentaje de embriones según el tamaño inicial y el cruzamiento  
Table 1. Percentage of embryos according to initial size and crossing genotype

	< 3,5	%	4-7,5	%	> 8	%
Mb 1 x MB	4,0	13,3	3,0	10,0	23,0	76,7
Mb 2 x MB	0,0	0,0	4,0	40,0	6,0	60,0
Mb 3 x MB	0,0	0,0	3,0	20,0	12,0	80,0
Total	4,0	7,3	10,0	18,2	41,0	74,5

### Influencia del tamaño del embrión y la temperatura de estratificación en el peso e incremento de peso de los embriones estratificados

Los factores estudiados a lo largo de la estratificación: peso e incremento de peso, se analizaron separadamente para los distintos cruzamientos observándose diferencias en respuesta entre los distintos genotipos.

El peso promedio de los embriones ha sido diferente en los distintos cruzamientos efectuados (figura 1).

#### Cruzamiento Mb1 x MB

En el cruzamiento de Mb1 x MB, el tamaño inicial del embrión tuvo una influencia altamente significativa en todos los factores estudiados durante el período de estratificación. (cuadro 2). Tanto el peso alcanzado a los 30 y 60 días de estratificación, como el incremento de peso correspondiente, fue mayor para los embriones de tamaño inicial mayor (figura 1).

La temperatura de estratificación en cambio sólo influyó significativamente para el

peso e incremento del peso a los 60 días de la siembra (cuadro 2). Los incrementos de peso fueron mayores a 4 °C.

Asimismo, se encontró una interacción significativa ( $P < 0,01$ ) entre el tamaño y la temperatura para el peso a los 60 días de estratificación y muy significativa ( $P < 0,001$ ) para el incremento de peso en ese momento. Los embriones pequeños ( $< 8$  mm) ganaron más peso a 0 °C que a 4 °C, mientras que los embriones grandes ( $> 8$  mm) ganaron más peso a 4 °C que a 0 °C (figura 1).

#### Cruzamiento Mb2 x MB

El tamaño inicial no influyó de manera significativa en los factores analizados para el cruzamiento Mb2 X MB (cuadro 3). Únicamente se encontró influencia significativa de la temperatura en el incremento de peso a los 60 días de la siembra. A 4 °C se produjeron mayores incrementos de peso en ambos tipos de embriones, mientras que a 0°C no se observaron diferencias en el peso entre embriones de tamaño inicial diferente (figura 1).

Cuadro 2. Valores del estadístico F y significación del análisis de varianza para el peso y el incremento de peso durante la estratificación in vitro de embriones en el cruzamiento Mb1 x MB

Table 2. *F-values and statistical significance of the analysis of variance of embryo weights and embryo-weight increments during in vitro stratification of Mb1 x MB embryos*

Fuente de variación	GL	Peso 30	Incremento 30	Peso 60	Incremento 60
Tamaño	1	32,629***	17,218***	36,877***	13,810***
Temperatura	1	0,073 ns	3,407 ns	6,267*	38,129***
Interacción	1	1,546 ns	3,083 ns	7,722**	22,6***

(\* , \*\* , \*\*\* ) = diferencias significativas a  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$  respectivamente.

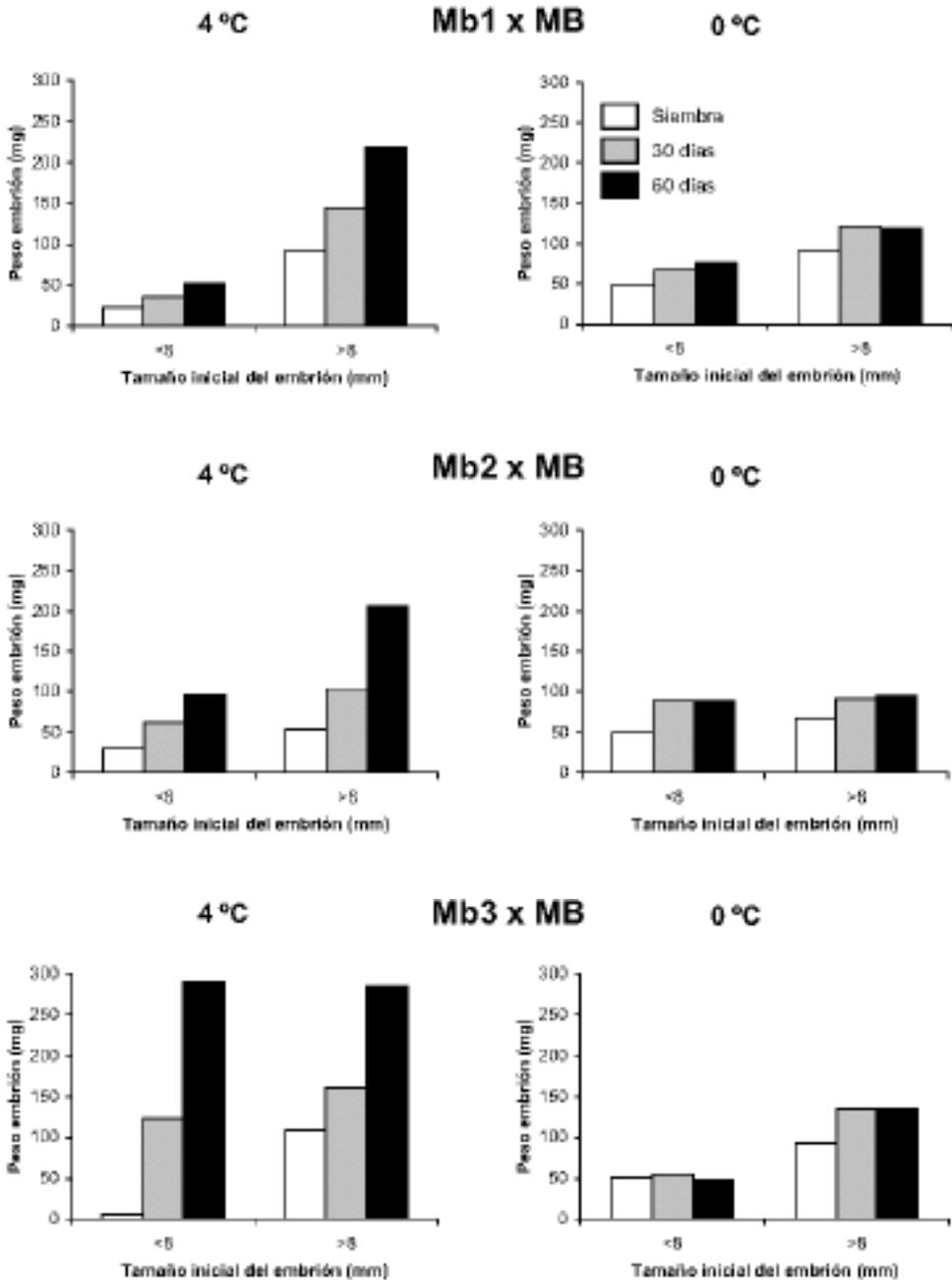


Figura 1. Peso promedio de los embriones de diferentes cruzamientos entre mirabolán y albaricoquero a los 30 y 60 días de estratificación a diferentes temperaturas.

Figure 1. Mean weight of embryos from different crosses between Myrobalan and apricot at 30 and 60 days of stratification at different temperatures.

Cuadro 3. Valores del estadístico F y significación del análisis de varianza para el peso y el incremento de peso durante la estratificación in vitro de embriones en el cruzamiento Mb2 x MB

Table 3. F-values and statistical significance of the analysis of variance of embryo weights and embryo-weight increments during in vitro stratification of Mb2 x MB embryos

Fuente de variación	GL	Peso 30	Incremento 30	Peso 60	Incremento 60
Tamaño	1	0,431 ns	0,431 ns	1,839 ns	4,575 ns
Temperatura	1	0,044 ns	0,044 ns	2,003 ns	16,295**
Interacción	1	0,368 ns	0,368 ns	1,523 ns	3,717 ns

(\* , \*\* , \*\*\* ) = diferencias significativas a  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$  respectivamente.

#### Cruzamiento Mb3 x MB

Para el cruzamiento Mb3 x MB el tamaño inicial del embrión influyó significativamente en su peso a los 30 días, pero no a los 60 días, cuando alcanzaron un peso similar (cuadro 4). La temperatura tuvo una influencia significativa tanto en peso del embrión a los 30 y a los 60 días de la estratificación, como en el incremento de peso para este momento, siendo en ambos casos superior a 4 °C (cuadro 4).

Cuando se partió de embriones más pequeños se obtuvieron mayores incrementos de peso a 4 °C a los 30 y 60 días del período de estratificación (figura 1)

En general a 0 °C no hubo un incremento de peso apreciable entre los 30 y 60 días para todos los genotipos y para los dos tamaños de embriones (figura 1)

#### Influencia de la temperatura, el tamaño y el genotipo en la germinación de embriones

El proceso de la germinación ha estado influido tanto por la temperatura de estratificación como por el tamaño y genotipo de la propia semilla. El efecto de la temperatura de estratificación ha sido muy notable ya que el 91% de las semillas germinaron cuando la

Cuadro 4. Valores del estadístico F y significación del análisis de varianza para el peso y el incremento de peso durante la estratificación in vitro de embriones en el cruzamiento Mb3 x MB

Table 4. F-values and statistical significance of the analysis of variance of embryo weights and embryo-weight increments during in vitro stratification of Mb3 x MB embryos

Fuente de variación	GL	Peso 30	Incremento 30	Peso 60	Incremento 60
Tamaño	1	8,438**	0,194 ns	10,17 ns	0,289 ns
Temperatura	1	5,363*	2,169 ns	22,890***	19,053***
Interacción	1	1,095 ns	1,229 ns	1,328 ns	0,572 ns

(\* , \*\* , \*\*\* ) = diferencias significativas a  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$  respectivamente.

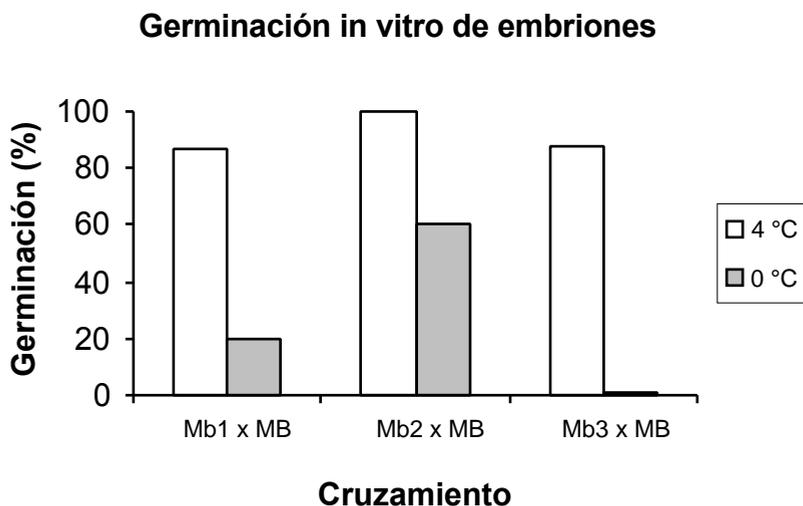


Figura 2. Porcentajes de germinación in vitro de embriones de diferentes cruzamientos entre mirobolán y albaricoquero a diferentes temperaturas de estratificación in vitro.  
*Figure 2. Germination percentages of embryos from different crosses between Myrobalan and apricot at different stratification temperatures.*

estratificación tuvo lugar a 4 °C, mientras solo el 26% germinó con una estratificación a 0 °C (figura 2). La germinación tuvo lugar generalmente cuando se pasaron a condiciones de luz y temperatura alta, pero en algunos casos sucedió durante el periodo de estratificación.

El tamaño del embrión influyó en la germinación. Los valores de germinación en condiciones óptimas (4 °C) han sido del 95,6% para embriones superiores a 8 mm, mientras que solo del 60% para tamaños inferiores a 8 mm.

Los distintos cruzamientos respondieron de manera diferente respecto a la germinación, marcando unas diferencias más notables a 0 °C. Los porcentajes de germinación oscilaron entre el 86 y el 100% a 4 °C, mientras que a 0 °C oscilaron entre el 0 y el 60 %.

El momento de aparición del brote y la radícula durante el proceso de estratificación se produjo de manera muy diferente

para las dos temperaturas de estratificación en los distintos cruzamientos estudiados (figura 3). A 4 °C y en los tres cruzamientos realizados, los embriones se encontraban germinando en más del 50% de los casos a la 8ª semana. A 0 °C, la germinación ocurrió a partir de la semana 18, cuando el material ya se encontraba en la cámara de cultivo a 23 °C. La aparición de la radícula a 4 °C es, en general, anterior a la aparición de un incipiente brote, no encontrándose diferencias en la secuencia del proceso entre los distintos cruzamientos.

## Discusión

Los datos presentados aquí muestran que la germinación in vitro de embriones inmaduros, de los genotipos híbridos utilizados, se ha realizado con éxito (más del 91%) cuando la estratificación se realizó a 4 °C.

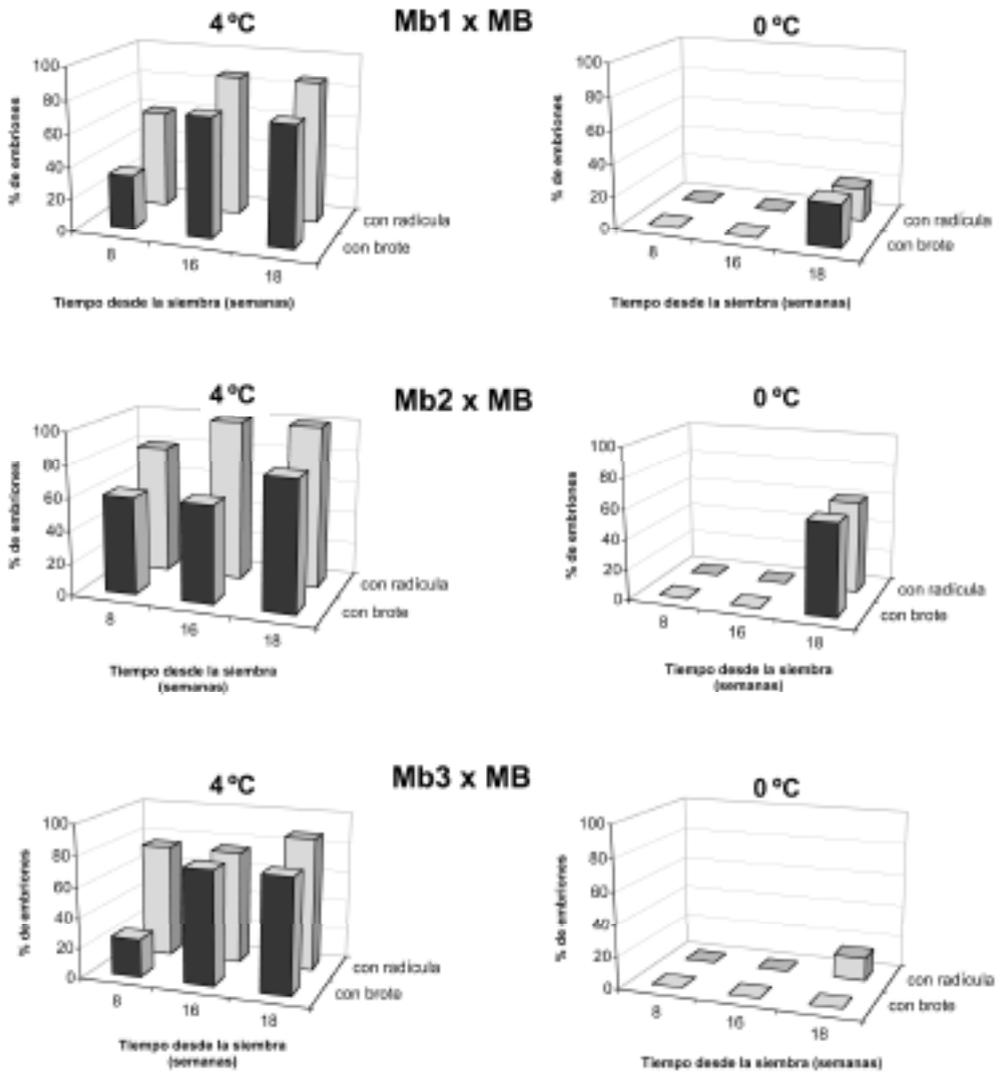


Figura 3. Evolución de los embriones de diferentes cruzamientos entre mirobolán y albaricoquero durante la estratificación a distintas temperaturas mostrando la aparición de la radícula y del brote (germinación).

Figure 3. Evolution of embryos from different crosses between Myrobalan and apricot at different stratification temperatures showing the appearance of the radicle and the shoot (germination).

Esto ha permitido su aplicación en la obtención eficaz de plántulas de semillas de cruzamientos interespecíficos dentro de un programa de mejora de patrones de albaricoquero

(ARBELOA *et al.*, 2001; DAORDEN *et al.*, 2001a y b).

El éxito del cultivo de embriones está relacionado con el estado de madurez del

embrión, del que depende el tamaño del mismo (BURGOS y LEDBETTER, 1993). Cuanto menor es el tamaño del embrión hay una mayor dependencia del medio en el cual se cultivan, siendo más difícil su desarrollo para formar plantas. Cuando el tamaño de los embriones es muy pequeño no llegan a desarrollarse *in vitro* (PIERIK, 1990). En el momento en que se llevó a cabo la cosecha de los frutos inmaduros (12 semanas después de la polinización), se encontraron embriones en diferentes estados de desarrollo y con diferentes tamaños por ser semillas provenientes de cruzamientos interespecíficos, con un grado de incompatibilidad polen-pistilo. En general, los embriones poseían un tamaño superior a los 8 mm, lo cual garantiza su germinabilidad, pero un 25,5% de los embriones utilizados fueron de menor tamaño. A pesar de esto, en nuestro caso se obtuvo una germinación total del 91% de los embriones cultivados, incluyendo los embriones menores de 8 mm que se consideran como no viables.

Durante la estratificación, tanto el peso de los embriones, como su incremento de peso, fueron considerados indicadores de su evolución. Estas características estuvieron condicionadas de diferente manera por diferentes factores: 1) la temperatura de estratificación, 2) el tamaño del embrión en el momento de su siembra y 3) el cruzamiento efectuado. De esta forma, se ha observado una gran influencia de la temperatura en el peso e incremento de peso observado a los 60 días después de la siembra. Una influencia menor se observó según el tamaño de siembra del embrión. Diferentes temperaturas y tiempos de estratificación *in vitro* han sido utilizadas en especies de *Prunus* por diversos autores. Las temperaturas varían entre 0 y 5 °C, mientras que la estratificación osciló entre 30 y 120 días (BASSI e INFANTE, 1994; BURGOS y LEDBETTER, 1993; CHAPARRO y SHERMAN, 1994; EMERSHAD y

RAMMING, 1994; LEDBETTER *et al.*, 1998). En este trabajo, en todos los cruzamientos evaluados, se advirtió una mayor respuesta en el peso de los embriones y en su ganancia de peso cuando la temperatura de estratificación fue de 4 °C.

La temperatura durante la estratificación resultó ser, además, un factor crítico tanto en la evolución de los embriones (momento de aparición de la radícula y del ápice caulinar), como en el porcentaje de germinación, independientemente del cruzamiento efectuado, de forma similar a la estratificación de semillas convencional (HERRERO, 1978). La estratificación a 4 °C adelantó el inicio de la germinación 10 semanas, en comparación con la estratificación a 0 °C, permitiendo reducir sensiblemente el tiempo necesario para la obtención de plántulas *in vitro*. A esta temperatura (4 °C) se lograron porcentajes de germinación del 91% en los embriones inmaduros de los tres cruzamientos frente a un promedio del 31% a 0 °C.

El cultivo de embriones y la estratificación a 4 °C permitió una adecuada germinación de semillas inmaduras procedentes de cruzamientos de programas de mejora. La técnica de la germinación *in vitro* descrita aquí ha permitido la puesta a punto de un método alternativo (ARBELOA *et al.*, 2001; DAORDEN *et al.*, 2001b) eficaz, más rápido y que ha proporcionado un mayor número de plantas híbridas obtenidas respecto al método convencional de germinación de semillas.

### Agaradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CONSID – DGA: P012/2001 ; CICYT: AGF98-0277-C04-01 y CICYT: AGL2001-2414-C04-01.

### Bibliografía

- ARBELOA A., GARCÍA E., DAORDEN M.E., ANDREU P., MARÍN J.A., 2000. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de mirabolán (*Prunus cerasifera* Ehrh.). ITEA 21 (Ext.), 59-61.
- ARBELOA A., DAORDEN M.E., GARCÍA E., MARÍN J.A., 2001. Successful establishment of *in vitro* cultures of *Prunus cerasifera* hybrids by embryo culture of immature fruits. Acta Hort. (en prensa).
- BASSI D., INFANTE R., 1994. Esperienze di embriocoltura nel miglioramento genetico di pesco e ciliege. Frutticoltura, 7-8, 65-70.
- BLAKE M.A., 1939. Some results of crosses of early ripening varieties of peaches. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 37, 232-241.
- BURGOS L., LEDBETTER C.A., 1993. Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35, 217-222.
- CHAPARRO J.X., SHERMAN W.B., 1994. Culture date and germination procedure affects success of nectarine ovule and embryo culture. Fruit Varieties Journal 48, 173-175.
- CHEÉ R., POOL R.M., 1987. Improved Inorganic Media Constituents For In Vitro Shoot Multiplication Of *Vitis*. Sci. Hort., 32, 85-95.
- DAORDEN M.E., GARCÍA E., ARBELOA A., MARÍN J.A., 2001a. Aplicación de la micropropagación a la obtención de patrones híbridos para albaricoquero. Actas de Horticultura (en prensa).
- DAORDEN M.E., GARCÍA E., MARÍN J.A., ARBELOA A., 2001b. Obtención de híbridos interespecíficos entre ciruelo y albaricoquero mediante el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros. IV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales, 5, Santiago de Compostela (España).
- EMERSHAD R.L., RAMMING D.W., 1982. In ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. c.v. "Thomson Seedless". HortScience 17, 576. (Abstr.)
- EMERSHAD R.L., RAMMING D.W., 1994. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 37, 55-59.
- GARCÍA E., DAORDEN M.E., MARÍN J.A., ARBELOA A., 2001. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *Prunus*. Actas de Horticultura. (en prensa).
- HARTMANN H.T., KESTER D.E., DAVIES F., 1990. En: Plant propagation. Principles and practices. Fifth Edition, 647 pp. Ed. Prentice-Hall International. Englewood Cliffs.
- HERRERO J., 1978. Estratificado de huesos de ciruelo Mirabolán (*Prunus cerasifera* Ehrh.). An. Aula Dei, 14, 173-180.
- LEDBETTER C.A., PALMQUIST D.E., PETERSON S.J., 1998. Germination and net *in vitro* growth of peach, almond and peach-almond hybrid embryos in response to mannitol inclusion in the nutrient medium. Euphytica, 103, 243-250.
- PIERIK R.L.M., 1990. Cultivo de embriones, pp. 139-147. En: Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 326 pp. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- RAMMING D.W., 1985. In ovulo embryo culture of early-ripening *Prunus*. HortScience 20, 419-420.
- RAMMING D.W., 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25, 393-398.
- (Aceptado para publicación el ? de ?????? de ??????)