



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

**EFFECTO DE PRECURSORES Y REGULADORES DE
CRECIMIENTO EN LA FORMACIÓN DE BROTES
ADVENTICIOS A PARTIR DE EXPLANTES DE LIMÓN PERSA
(*Citrus latifolia*)**

ADRIANA ISABEL PÉREZ LUNA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: **Efecto de precursores y reguladores de crecimiento en la formación de brotes adventicios a partir de explantes de limón persa (*Citrus latifolia*)**, realizada por la alumna: **Adriana Isabel Pérez Luna** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

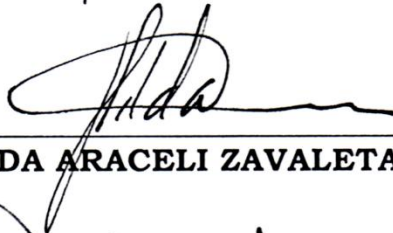
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. MA. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR



DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA

ASESOR



DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR



DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2013

EFFECTO DE PRECURSORES Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA FORMACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS A PARTIR DE EXPLANTES DE LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia*)

**Adriana Isabel Pérez Luna, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2013.**

RESUMEN

En México, la citricultura se ha visto afectada por diferentes plagas y enfermedades, ocasionando grandes daños en la producción. Limón persa (*Citrus latifolia* Tan.) por ser un cítrico agrio está catalogado como una especie susceptible a una de las enfermedades más devastadoras como lo es el Huanglongbing (HLB). Una alternativa viable es el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a enfermedades. Para ello se requiere un protocolo eficiente de brotación adventicia. En este estudio se caracterizaron (cualitativa y cuantitativamente) cambios celulares e histológicos provocados por compuestos precursores de fitohormonas como adenina, sulfato de adenina (80 y 100 mL L⁻¹) y ácido-4-fluorofenoxiacético (4-FAA) (0.2 mL L⁻¹), así como activadores de división celular poco comunes como triacontanol (4.9 mL L⁻¹) en segmentos internodales de limón persa (*C. latifolia*) cultivados *in vitro*, desde las primeras etapas de la morfogénesis hasta la formación de brotes adventicios. Explantes establecidos en medio MS suplementado con los diferentes compuestos, bajo un fotoperiodo de 16 h. luz/8 h. oscuridad y una temperatura de 30 ± 2°C fueron tomados a los 0, 10, 20 y 30 días después del establecimiento *in vitro*. Se demostró que el uso de éstos compuestos modifica los explantes en diversos tejidos, en todos los tratamientos se observó formación de callo proveniente de la región del cambium vascular formado por divisiones periclinales originando un gran número de células parenquimáticas. Los explantes cultivados en medio con precursores de auxinas (4-FAA) dieron como resultado la formación de un callo más pronunciado, en el que se observaron regiones meristemáticas (distribuidas en diferentes regiones del callo) caracterizadas por células pequeñas con núcleos prominentes, citoplasma denso y placas de división celular, las cuales podrían ser inducidas

para originar brotes adventicios. Con los precursores de citocininas (adenina y sulfato de adenina) se logró obtener brotación adventicia. Un aporte importante de este trabajo fue la identificación de cuatro variables altamente relacionadas con la formación de brotes adventicios: 1) ancho de floema, 2) índice de dilatación del cambium y floema, 3) altura de callo y 4) regiones meristemáticas. La originalidad de este trabajo radica en el estudio de la respuesta mofo-histológica a compuestos poco comunes para la inducción de brotes adventicios en explantes de limón persa.

Palabras claves: *Citrus latifolia*, callo, cambium, brotación adventicia.

DEDICATORIAS

A **DIOS** por ser mi eje, por no abandonarme nunca y permitirme ver la luz aún en los días más oscuros.

A mis **PADRES** Edmundo Pérez Barraza y María Isabel Luna Vázquez, por ser el pilar y mi mayor inspiración. Por su infinito apoyo, confianza, comprensión, cuidados, grandes y sabios consejos, pero sobre todo por su gran amor que trasciende a pesar de la distancia.

A mis **HERMANAS** Alejandra y Aimé, por la confianza depositada, por sus muestras de amor, por los consejos y las palabras de aliento a cada momento, por impulsarme a ser mejor persona, por ser aparte de hermanas mis más grandes amigas.

A mis **ABUELITOS** Esther† y Alberto† por el amor y consejos que me dieron durante su vida, así como las bendiciones recibidas desde el cielo a cada momento QEPD. María del Refugio y Juan, por su amor, rezos y miles de bendiciones que me obsequian cada día.

A todos y cada uno de mis **TIOS** Pedro, Mila, Hortencia†, Beto, José Luis, Gelo, Víctor†, Sanjuis, José, Juan, Miguel, Tita, pero especialmente a Hilda, Martha, Elsa y Silvia, por su apoyo incondicional, los valiosos consejo, las palabras de aliento, la preocupación constante y su inmenso cariño.

A mis **PRIMOS**, los cuales son muchos y los quiero tanto, pero principalmente a Víctor y Allan quienes siempre estuvieron al pendiente de mis avances, por su motivación y apoyo constante, sus visitas que eran un motivo de gran alegría, pero sobre todo por el gran cariño y amor, lazo que desde pequeños nos mantiene unidos.

Finalmente y no menos importante a todos mis **AMIGOS**, Balthazar, Araceli, Dolores (Mado), Alma, Patricio, Iván, René, Gerardo pero especialmente a Isis, Emma, Celeste, Gabriel, Alejandro y Mario, todos ustedes hicieron de esta experiencia la mejor de mi vida, va dirigida a ustedes por ser mi segunda familia, los recordaré siempre con mucho cariño y los extrañaré al momento de partir. Isis, Emma y Celeste ustedes fueron como mis hermanas en esta aventura, cada momento a su lado fue una bendición, las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** porque cada día me brinda la posibilidad de luchar y alcanzar mis metas y sueños, colmándome de salud y bendiciones.

A **CONACYT** por financiar esta investigación y otorgarme una beca para realizar satisfactoriamente mis estudios de postgrado.

Al **INIFAP** de Veracruz y Nayarit, especialmente al M.C. Sergio Curti y la M.C. Hilda Pérez, por la donación y envío de material vegetal de limón persa para el establecimiento *in vitro*.

Al **COLPOS** por ser un centro de investigación de calidad en el cual pude fortalecer mis conocimientos y habilidades científico-teórico-prácticas.

Al **LABORATORIO DE FRUTICULTURA** en el cual pude realizar mi proyecto de investigación, al hacer uso de instalaciones, material y equipo.

A mi **CONSEJO PARTICULAR**, infinitas gracias por su incondicional apoyo, sus valiosos conocimientos y experiencia, por el tiempo de calidad, paciencia y disposición que cada uno de ustedes me dedicó, su gran asesoría y aportes al proyecto, por sus sabios consejos y contribuciones, pero sobre todo por la gran calidez humana que tiene cada uno.

Dra. Alejandrina Robledo, muchas gracias por su tiempo, su colaboración y buenos consejos.

Dra. Araceli Zavaleta, gracias por la enorme confianza depositada en mí, por el espacio brindado en su laboratorio y su compañía en tantos días de trabajo.

Dr. Gustavo Mora, mil gracias por su asesoría estadística, su apoyo para participar en el congreso de Colima, por las valiosas contribuciones al proyecto, por su amabilidad, disponibilidad de tiempo, por el trato cordial y su amistad.

Dra. Alejandra Gutiérrez, la dejé al final porque no tengo palabras para agradecerle todo lo que hizo por mí durante este tiempo, gracias por permitirme ser parte de sus estudiantes, de colaborar en este proyecto, de formar parte de este gran equipo, por la confianza depositada al momento de realizar mi investigación, por su guía y asesoramiento pero a la vez por darme independencia y la posibilidad de tomar decisiones que contribuyeran a la investigación, por la aprobación para participar en los diferentes congresos, por su infinita paciencia y por estar siempre pendiente de mí en todos los aspectos. MUCHAS GRACIAS.

A mi **FAMILIA y AMIGOS** por haber estado en momentos difíciles y en momentos llenos de felicidad, gracias por ayudarme con mi tesis, motivarme cada día, permitirme ser parte de sus vidas e iluminar la mía con todas sus muestras de afecto, de verdad mil gracias, sin ustedes esto hubiera sido muy difícil.

Dr. Villegas, Dr. Arellano, Dra. Analí, Dr. Cabrera, Dra. Colinas muchas gracias por su apoyo y consejos.

A todos los laboratoristas que colaboraron, Sr. Guillermo, Sr. Miguel, Sra. Isidra, Ale y Greta, muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Características agronómicas	2
2.2 Importancia de los cítricos a nivel mundial y producción de cítricos en México ..	2
2.3 Enfermedades en cítricos.....	3
2.4 Manejo de plagas y enfermedades.....	5
2.6 Organogénesis y embriogénesis	7
2.6.1 Efecto de reguladores de crecimiento en organogénesis de frutales.....	9
2.6.2 Efecto de precursores de reguladores de crecimiento (del tipo auxínico y citocinínico) en la inducción de brotes mediante organogénesis.....	16
2.7 Anatomía y fisiología del tallo de los cítricos	23
2.7.1 Tejido dérmico.	23
2.7.2 Tejido vascular.....	24
2.7.3 Tejido fundamental.....	25
2.8 Alteraciones histológicas en cítricos ocasionadas por el efecto de reguladores de crecimiento.....	25
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 ETAPA 1: Establecimiento <i>in vitro</i> de limón persa (<i>C. latifolia</i>).....	29
3.1.1 Material vegetal.....	29
3.1.2 Establecimiento <i>in vitro</i>	29
3.1.3 Desinfestación del material vegetal.....	29
3.1.4 Medios de cultivo.....	32
3.1.5 Efecto de diferentes compuestos (fitohormonas, precursores de fitohormonas y activadores de división celular) en el medio de cultivo para la inducción de brotes adventicios.	33
3.2 ETAPA 2: Estudio histológico en explantes de cítricos establecidos <i>in vitro</i> para evaluar el efecto de precursores de fitohormonas y activadores de división celular.	36
3.2.1 Establecimiento de los experimentos y muestreo del material vegetal.	36
3.2.2 Histología de segmentos internodales de limón persa.	36

3.2.3 Variables evaluadas.....	37
3.3 Análisis estadístico para variables cuantitativas del estudio histológico.....	40
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
4.1 Establecimiento in vitro de limón persa (<i>C. latifolia</i>)	42
4.1.1 Desinfestación	42
4.1.2 Efecto de diferentes compuestos (fitohormonas, precursores de fitohormonas y activadores de división celular) en el medio de cultivo en la inducción de brotes adventicios.....	48
4.2 Estudio histológico del efecto de precursores de fitohormonas y activadores de división celular en explantes establecidos <i>in vitro</i>	63
4.2.1 Epidermis.....	63
4.2.2 Corteza.....	63
4.2.3 Floema y Cambium.	72
4.2.4 Xilema.....	79
4.2.5 Médula.....	89
4.2.6 Callo.	91
4.2.7 Regiones meristemáticas.....	96
4.2.8 Meristemas en fila.	102
4.2.9 Brotes adventicios.....	103
4.3 Variables relacionadas con la formación de brotes adventicios.	105
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	110
CAPITULO VI. LITERATURA CITADA	112
CAPÍTULO VII. ANEXOS.....	128

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos de desinfestación para el establecimiento de varetas de limón persa.....	31
Cuadro 2. Inducción de brotes adventicios con diferentes concentraciones de BAP, AIA y ANA.....	34
Cuadro 3. Porcentaje de contaminación (%C) y mortandad (%M) en diferentes experimentos de desinfestación para el establecimiento de explantes (diferente origen de procedencia) in vitro.	43
Cuadro 4. Coeficientes de correlación Pearson, $N = 24$ Prob $> r $ suponiendo $H_0: \rho=0$	106
Cuadro 5. Evaluación de los tratamientos mediante el análisis de ABC en la variable ancho de floema.	108
Cuadro 6. Evaluación de los tratamientos mediante el análisis de ABC en la variable índice de dilatación del tejido vascular.	108
Cuadro 7. Evaluación de los tratamientos mediante el análisis de ABC en la variable altura de callo.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de fitohormonas en la producción de brotes y raíces para la regeneración de plantas.	10
Figura 2. Corte transversal de un segmento internodal de limón persa.	39
Figura 3. Corte longitudinal de segmento internodal establecido en 4-FAA. ..	40
Figura 4. Explantes de limón persa provenientes de campo, muertos y/o contaminados después del tratamiento de desinfestación.....	47
Figura 5. Supervivencia de explantes nodales e internodales, provenientes de Veracruz	48
Figura 6. Segmento internodal y nodal, en medio MS suplementado con BA (2 mg L ⁻¹).	51
Figura 7. Explantes de limón persa establecidos en medio MS suplementado con BA, combinadas con ANA o AIA.....	51
Figura 8. Brote axilar establecido en medio MS suplementado con 1.5 mg L ⁻¹ de AG3, el cual logró una elongación de hasta 1.5 cm.	53
Figura 9. Brotes axilares establecidos en medio MS suplementado con 1.5 mg L ⁻¹ de AG3,.....	53
Figura 10. Elongación de brotes axilares en medio MS con 1.5 mg L ⁻¹ de AG3	54
Figura 11. Brote axilar sin senescencia foliar por efecto del nitrato de plata y con formación de entrenudos cortos.	55
Figura 12. Brotes adventicios provenientes de segmentos internodales de limón persa establecidos en medio MS suplementado con sulfato de adenina y adenina a 80 mg L ⁻¹	57
Figura 13. Brote adventicios proveniente de un segmento internodal a los 60 días de establecimiento en medio MS suplementado con 80 mg L ⁻¹ de sulfato de adenina.....	57

Figura 14. Formación de callos en segmentos internodales a los 20 DDE en medio MS suplementado con: adenina, triacontanol y sulfato de adenina.....	61
Figura 15. Formación de callo en segmentos internodales establecidos en medio MS suplementado con 0.2 mg L ⁻¹ de 4-FAA.	62
Figura 16. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el ancho relativo de corteza (AC) a los 10, 20 y 30 DDE.....	66
Figura 17. Cortes transversales de limón persa para la evaluación del ancho de corteza externa.....	67
Figura 18. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el diámetro relativo de células de corteza (DCC) a los 10, 20 y 30 DDE	68
Figura 19. Cortes transversales de limón persa para la evaluación de diámetro de células de corteza.....	69
Figura 20. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el ancho de corteza (AC) a los 10, 20 y 30 DDE.	71
Figura 21. Cortes longitudinales de limón persa para evaluar el ancho de corteza	72
Figura 22. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el ancho relativo de floema (AF) a los 10, 20 y 30 DDE.	76
Figura 23. Cortes transversales de limón persa para la evaluación de ancho de floema.....	77
Figura 24. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el índice de dilatación de cambium y floema (DCF) a los 10, 20 y 30 DDE.....	78
Figura 25. Cortes longitudinales de limón persa donde se observa una dilatación en la región del cambium y floema	79

Figura 26. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el DTXF a los 10, 20 y 30 DDE.	81
Figura 27. Cortes transversales de explantes internodales de limón persa, ...	82
Figura 28. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el Ancho relativo de xilema fascicular (AXF) a los 10, 20 y 30 DDE.	85
Figura 29. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el número relativo de elementos traqueales de xilema fascicular (TXF) a los 10, 20 y 30 DDE.	86
Figura 30. Cortes transversales de explantes de limón persa provenientes....	87
Figura 31. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre ancho relativo de xilema secundario interfascicular (AXIF) a los 10, 20 y 30 DDE.	88
Figura 32. Cortes transversales de limón persa provenientes del estado de Veracruz. Ancho de xilema secundario interfascicular.....	89
Figura 33. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el diámetro relativo de células de médula (DCM) a los 10, 20 y 30 DDE	90
Figura 34. Cortes transversales de limón persa para la evaluación del diámetro de células de médula	91
Figura 35. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre AlCa a los 10, 20 y 30 DDE.	94
Figura 36. Cortes longitudinales de limón persa donde se observa formación de callo a los 30 DDE bajo el efecto de cuatro compuestos diferentes en explantes provenientes de Nayarit y Veracruz.....	95
Figura 37. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el número de RM a los 10, 20 y 30 DDE.	98
Figura 38. Cortes longitudinales de limón persa del tratamiento de 4-FAA a los 20 y 30 DDE, con formación de regiones meristemáticas.	99

Figura 39. Frecuencia de regiones meristemáticas en explantes cultivados en 4-FAA, en la zona central del callo a los 20 y 30 DDE.	100
Figura 40. Frecuencia de regiones meristemáticas en explantes cultivados en 4-FAA, en la periferia del callo a los 20 y 30 DDE.....	100
Figura 41. Regiones meristemáticas en 4-FAA, en la zona central y periférica del callo identificadas desde los 20 DDE en explantes provenientes de Nayarit y Veracruz.....	101
Figura 42. Meristemas en fila identificados en explantes de Nayarit, provenientes del tratamiento 4-FAA a los 20 DDE	102
Figura 43. Meristemas en fila identificados en explantes de Veracruz, provenientes del tratamiento 4-FAA a los 20 DDE	103
Figura 44. Corte transversal donde se observa la formación de un brote adventicio.....	104

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

En México la citricultura representa una de las actividades más importantes dentro de la fruticultura del país, la producción de limón persa representa una importante fuente de empleos e ingresos para más de 90,000 familias mexicanas (Esquivel, 2011). Actualmente, la producción de cítricos se ha visto afectada principalmente por patógenos de importancia cuarentenaria (Virus de la tristeza de los cítricos (CTV), HLB, entre otros) que han acabado con las industrias cítricas de otros países. Los cítricos agrios como limón mexicano y limón persa son altamente susceptibles a la enfermedad del HLB (Esquivel, 2012), la cual está considerada como una de las enfermedades más devastadoras y está presente en nuestro país (Península de Yucatán y Colima principalmente) (Flores, 2011), lo que representa un latente riesgo para la sustentabilidad de la citricultura mexicana (SENASICA, 2012). Debido a ello se requiere de tecnologías como la ingeniería genética para desarrollar variedades comerciales de cítricos resistentes a enfermedades, mediante la producción de plantas transgénicas (Rocha-Peña, 1995; Curti-Díaz, 2000; Robles, 2006; Palacios, 2007). Para la aplicación de estas tecnologías es necesario contar con un protocolo eficiente de regeneración que involucra la diferenciación de brotes o raíces a partir de células formadas de *novo*, es decir, de estructuras no preexistentes (Litz y Jarret, 1991). Considerando que uno de los factores más importantes en la organogénesis adventicia es el uso de reguladores de crecimiento, ya que son compuestos químicos (naturales o sintéticos) involucrados en los procesos de desdiferenciación y diferenciación necesarios para la organogénesis capaces de actuar en pequeñas dosis (Raven *et al.*, 1992; Marques *et al.*, 2011), se planteó como hipótesis que el uso de precursores de reguladores y activadores de la división celular, inducirá cambios anatómicos que favorezcan la formación de brotes adventicios en explantes de limón persa. Teniendo como objetivo caracterizar los cambios celulares histológicos inducidos por adenina, sulfato de adenina, triacontanol y 4-FAA en segmentos internodales de limón persa provenientes de árboles adultos.

CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características agronómicas

Limón persa pertenece a la familia de las *Rutaceas*, está clasificado dentro del género *Citrus*, su nombre científico es *Citrus latifolia* y se conoce comúnmente con el nombre de limón persa, limón Tahití o limón sin semillas.

El limón persa, es una especie frutal originaria de Asia, árbol perennifolio de bajo porte, copa abierta y producción mediana (Cruz *et al.*, 2003), el cual tiene espinas en cada una de sus yemas laterales, las hojas son unifoliadas, medianas y poseen un peciolo alado pequeño, las inflorescencias son blancas de 5 pétalos, sus frutos se caracterizan por ser de gran tamaño, de cáscara gruesa, un intenso color verde y glándulas de aceites esenciales (Agustí, 2003); su sabor es menos ácido y posee un contenido ligeramente mayor de vitamina C comparado con el resto de los cítricos, su principal característica es que carecen de semillas (Cruz *et al.*, 2003). Se desarrolla principalmente en una franja que se localiza desde el Ecuador hasta los 0 grados latitud norte y sur, en donde predominan los climas tropicales y subtropicales (Agustí, 2003).

2.2 Importancia de los cítricos a nivel mundial y producción de cítricos en México

Los cítricos son unos de los frutales de mayor importancia en el mundo, la superficie cultivada es de más de 7 millones de hectáreas en más de 90 países. Desde hace más de 10 años, en México se producen diversas especies de cítricos, las principales son naranja dulce (*Citrus sinensis*), limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), limón persa (*Citrus latifolia*), toronja (*Citrus pardisi*) y mandarina (*Citrus reticulata*) (Curti *et al.*, 2000). Actualmente el país es productor de limas y limones, ocupando el primer lugar con una producción de

más de 2 millones 148 mil de toneladas·ha⁻¹ (FAOSTAT, 2013) y una superficie de más de 555 mil ha. De esta superficie el 60% corresponde a naranjas, el 30% a limón mexicano y el 5% limón persa, mientras que el resto corresponde a toronjas, mandarinas y tangerinas (SIAP, 2012). El limón persa es un frutal de gran importancia económica para el país, cada año aumenta su superficie de cultivo y actualmente se desarrolla en un gran número de estados, destacando Veracruz y Michoacán con cerca del 23% de la producción, seguidos por Colima (20%), Oaxaca (11%) y Yucatán (6%). Entre la población mexicana existe una gran preferencia por el limón mexicano, por lo que la producción del limón persa se destina a la exportación (Curti *et al.*, 2000), siendo los principales países USA, España, Francia y Canadá (FAOSTAT, 2013).

En México, la citricultura representa una de las actividades más importantes dentro de la fruticultura de nuestro país, constituye una gran fuente de empleos e ingresos para más de 90, 000 familias mexicanas con un valor de 5,242 MDP (millones de pesos), generándose aproximadamente 320 mil empleos (directos e indirectos) siendo entonces una gran actividad agrícola para la economía del país. Los empleos generados engloban todos los eslabones de la cadena productiva, que van desde la producción de plantas en viveros, producción de huertas comerciales, empaque, industria, transporte y comercialización de la fruta o derivados de la misma (Esquivel, 2012). El limón persa se produce principalmente para consumo en fresco, aunque también se utiliza en la elaboración de bebidas no alcohólicas y en la industria de perfumes y cosméticos.

2.3 Enfermedades en cítricos

La producción de cítricos se ve afectada por diferentes problemas: comerciales, producción, manejo y fitosanidad, este último aspecto resulta ser

de los más importantes. Las plagas y enfermedades de importancia agrícola son reguladas por estancias gubernamentales en el país, tal es el caso del Citrus tristeza virus (CTV) y su vector el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) (Lee *et al.*, 1996), la mancha negra de los cítricos (*Guignardia citricarpa* Kiely), el cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) y el HLB y sus vectores *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* (Flores, 2011; SENASICA, 2013) siendo considerada ésta última, la enfermedad más devastadora en la actualidad.

El CTV es originario de Asia y se ha diseminado a todo el mundo por acción mecánica y por la acción de su principal vector (pulgón café) (Robles, 2006), se introdujo a México mediante la utilización de injertos infectados (Herrera, 2009), el agente causal es un virus, conocido como un complejo viral de la tristeza de los cítricos, el CTV ataca a todas las especies del género *Citrus* siendo la más susceptible naranjo agrio, los síntomas característicos de esta enfermedad son declinamiento, disminución de tamaño, amarillamiento de las hojas, epinástia, frutos de mala calidad y muerte de los árboles, según el tipo de cepa del virus que se encuentre presente en el árbol (Zhou *et al.*, 2007; Quiroz-Velásquez *et al.*, 2008).

La mancha negra de los cítricos es causada por el hongo *Guignardia citricarpa* Kiely, este se produce en hojarasca y ramas muertas, lo cual es un importante fuente de inóculo. Las lesiones se forman en frutos, ramitas y hojas, presentan manchas pequeñas de forma redonda, hundida y necrótica con un halo clorótico (LANREF¹, 2013).

Cancro de los cítricos es una enfermedad cuyo agente causal es la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (gram negativa), la cual se dispersa

¹ Reunión Regional del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF). Reconocimiento de plagas reglamentadas de los cítricos (Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria, LANREF). Cholula, Puebla. 18-21 de junio.

mediante el viento, la lluvia y uso de herramienta contaminada. El minador de los cítricos facilita la infección y diseminación del cancro de los cítricos, ya que las lesiones que causa facilitan la penetración de la bacteria. Los síntomas en las plantas son daños en hojas, ramas y frutos, causando abultamientos con un centro marrón y halo amarillo (LANREF¹, 2013).

El HLB conocido también como dragón amarillo o enverdecimiento de los cítricos, fue reportado por primera vez en China provocando la muerte de un gran número de árboles en un lapso de tiempo no mayor a 2 años, su agente causal es una bacteria (*Candidatus Liberibacter spp.*), su principal vector es el psílido asiático de los cítricos, aunque también se transmite por material vegetal de propagación (Flores, 2011). La enfermedad está presente en prácticamente todas las zonas cítricas del mundo, en México, se detectó por primera vez en el estado de Yucatán en el 2009, actualmente ha sido identificada en 11 estados (SENASICA, 2012). El HLB ataca a todos los cítricos, siendo más susceptibles los cítricos agrios (limón persa y limón mexicano) que naranja dulce (Esquivel, 2012), sus principales síntomas son: defoliación de árboles, amarillamiento, reducción de tamaño del árbol y de frutos, engrosamiento y aclaramiento de las nervaduras, así como moteado del follaje, aunque su síntoma más evidente es la presencia de hojas amarillas que contrastan con el color verde las hojas sanas y/o manchas irregulares y asimétricas, mezcladas con el verde normal de las hojas teniendo una nítida división entre ellas (clorosis asimétrica) (Fundecitrus, 2009).

2.4 Manejo de plagas y enfermedades

A nivel mundial, las estrategias para el manejo de enfermedades se basan en la erradicación de árboles infectados, cuarentenas, saneamiento, monitoreo, control del vector mediante el uso de insecticidas y/o el uso de enemigos naturales, protección cruzada, uso de portainjertos resistentes, así como el establecimiento de viveros modernos para producir plantas libres de

enfermedades, utilizando material de propagación analizado como libre de enfermedad (Curti-Díaz *et al.*, 2000; Irey *et al.*, 2008; Flores, 2011). Sin embargo, estas medidas no han sido suficientes, ya que cuando una variante severa del virus de la tristeza es portado por *T. citricida* o ante la presencia del HLB da como resultado pérdidas a gran escala en corto tiempo (Palacios, 2007; Flores, 2011).

Diversos autores (Rocha-Peña, 1995; Curti-Díaz, 2000; Robles, 2006; Palacios 2007) comentan que una buena estrategia sería el desarrollo de nuevas variedades mediante la utilización de la tecnología denominada ingeniería genética, ya que en muchas áreas la han utilizado para diversos fines. Ellos sugieren que esta herramienta es una alternativa para desarrollar variedades comerciales de cítricos resistentes a virus, mediante la producción de plantas transgénicas, transformadas con genes virales o porciones de ellos, que les confieran resistencia a enfermedades virales (CTV y CiLV) (Palacios, 2007), o el uso de péptidos antimicrobianos para resistencia a bacterias (HLB) (Freitas-Astúa², 2011). Esta alternativa parece viable cuando se toman en cuenta todas las desventajas que tienen las plantas leñosas y en especial los cítricos para realizar mejoramiento convencional, tales como: la embrionía nucelar (apomixis), alto grado de heterocigocidad, casos de esterilidad o incompatibilidad y el largo periodo juvenil de los árboles, impidiendo con ello la incorporación de genes de resistencia que puedan estar presentes en algunos géneros cercanos a los cítricos (Robles, 2005). Por estas razones es que la transformación genética se convierte en una importante alternativa de mejoramiento para la resistencia a enfermedades.

² Freitas-Astúa J. 2011. Búsqueda de estrategias biotecnológicas alternativas para el control del HLB de los cítricos en Brasil. 2° Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México.

2.6 Organogénesis y embriogénesis

La morfogénesis es la regeneración de brotes, raíces o embriones, para dar lugar a una planta mediante dos vías: embriogénesis somática y organogénesis, los cuales pueden ser directos (células diferenciadas que dan origen a una nueva estructura a partir del tejido original de la planta, sin formación de callo) o indirectos (células no especializadas, desorganizadas y desdiferenciadas, formación de callo). Estos procesos se basan en la totipotencia celular por la que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas (Levitus *et al.*, 2004; Davey *et al.*, 2010). Estos procesos morfogenéticos pueden ser directos o indirectos.

Para estas dos vías (embriogénesis y organogénesis) se involucran tres fases, el cual implica un desarrollo organizado que consiste en la activación de células quiescentes o inactivas para que sean capaces de dividirse (Montoya, 1991; Yancheva *et al.*, 2003; Duclercq *et al.*, 2011).

Fase 1. Las células adquieren competencia morfogénica o capacidad para responder a señales hormonales. La desdiferenciación consiste en que las células adultas vivas, aun cuando sean células especializadas y con una estabilidad fisiológica, puedan recobrar su actividad meristemática cuando son estimuladas adecuadamente. Este proceso se puede ver afectado cuando ocurre una modificación muy profunda del protoplasto o su desaparición (Strasburger *et al.*, 2004). Se desarrolla actividad meristemática, la cual consiste en la activación metabólica de las células quienes tendrán la facilidad de volver una célula quiescente (inactiva) en células en división y con vía a desdiferenciación (Montoya, 1991) (desdiferenciación celular).

Fase 2. Las células se vuelven competentes. Son células que adquieren capacidad inductiva (determinación de las células para formar órganos

específicos en respuesta a señales exógenas producidas por hormonas y a la interacción celular) (Inducción).

Fase 3. Las células se diferencian morfológicamente. Formación de órganos independientemente de la aplicación de reguladores exógenos (reacción a señales específicas) (diferenciación).

La embriogénesis es uno de los procesos más importantes en el ciclo de vida de las plantas, el cual comienza con una fecundación doble (embriogénesis cigótica), seguido de la determinación de los ejes embrionarios (basal y apical) y el cambio morfológico de éstos (globular, torpedo y corazón). Este proceso es regulado por numerosos factores, incluyendo fitohormonas, enzimas y otras sustancias relacionadas con la embriogénesis (Ikeda *et al.*, 2006).

La embriogénesis somática es el proceso asexual por el cual células somáticas diferencian en embriones somáticos (sin fusión de gametos, no forma conexión vascular con el tejido original), sin embargo, los embriones somáticos son morfológicamente parecidos a los embriones cigóticos. Durante este proceso se lleva a cabo la expresión de diferentes genes que confieren a las células somáticas la capacidad de manifestar su potencial embriogénico. Este proceso implica por lo tanto una gran cantidad de eventos moleculares que abarcan no solo la expresión de genes, sino diversas vías de transducción de señales de activación/represión de una gran cantidad de genes, los cuales provocan cambios fisiológicos, bioquímicos, metabólicos y morfológicos (Chugh and Kurana, 2002; von Arnold *et al.*, 2002; Levitus *et al.*, 2004; Jiménez, 2005; Ikeda *et al.*, 2006).

La organogénesis es la formación de brotes o raíces mediante el cultivo *in vitro* de explantes (directa) o de callos (indirecta). Este proceso puede ocurrir mediante dos vías; organogénesis axilar u organogénesis adventicia. La

organogénesis axilar es la formación de brotes a partir de yemas preexistentes, mientras que la organogénesis adventicia (de *novo*) consiste en la inducción de regiones meristemáticas. En plantas dicotiledóneas y en áreas como cultivo *in vitro*, micropropagación e ingeniería genética, la producción de brotes adventicios vía organogénesis es muy usada (Litz y Jarret, 1991; Montoya, 1991; Moore *et al.*, 1992).

La organogénesis *in vitro* está influenciada por diferentes factores como: el explante (edad ontogénica y fenológica, tipo, edad, tamaño, posición), medio de cultivo (agente gelificante, pH), reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico), temperatura, luz, tamaño de contenedores, humedad relativa, genotipo de la planta, entre otras, donde todos juegan un papel muy importante en la respuesta morfogénica de una planta en particular (Litz y Jarret, 1991; Montoya, 1991).

2.6.1 Efecto de reguladores de crecimiento en organogénesis de frutales.

A la fecha se sabe que la organogénesis adventicia es regulada por diferentes factores como el tipo del explante, factores ambientales, factores químicos (fitohormonas), entre otros. Actualmente, muchos de los estudios que se realizan con fitohormonas han servido para dilucidar la regulación de procesos como la inducción de raíces y brotes (Figura 1) (Marques *et al.*, 2011).

Las fitohormonas son importantes reguladores químicos del crecimiento, sustancias químicas producidas en determinados tejidos de la planta y transportadas a otros tejidos, provocando una respuesta fisiológica, en pequeñas dosis (Raven *et al.*, 1992).

Las fitohormonas se clasifican en cinco grupos básicos dependiendo del origen y la respuesta que provocan: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Sin embargo dentro de esta clasificación los que se utilizan con mayor frecuencia son las auxinas y citocininas, ya que son las encargadas de regular procesos de crecimiento y división celular, formación de callo y brotación (Gaspar *et al.*, 1996; Coenen y Lomax, 1997; Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

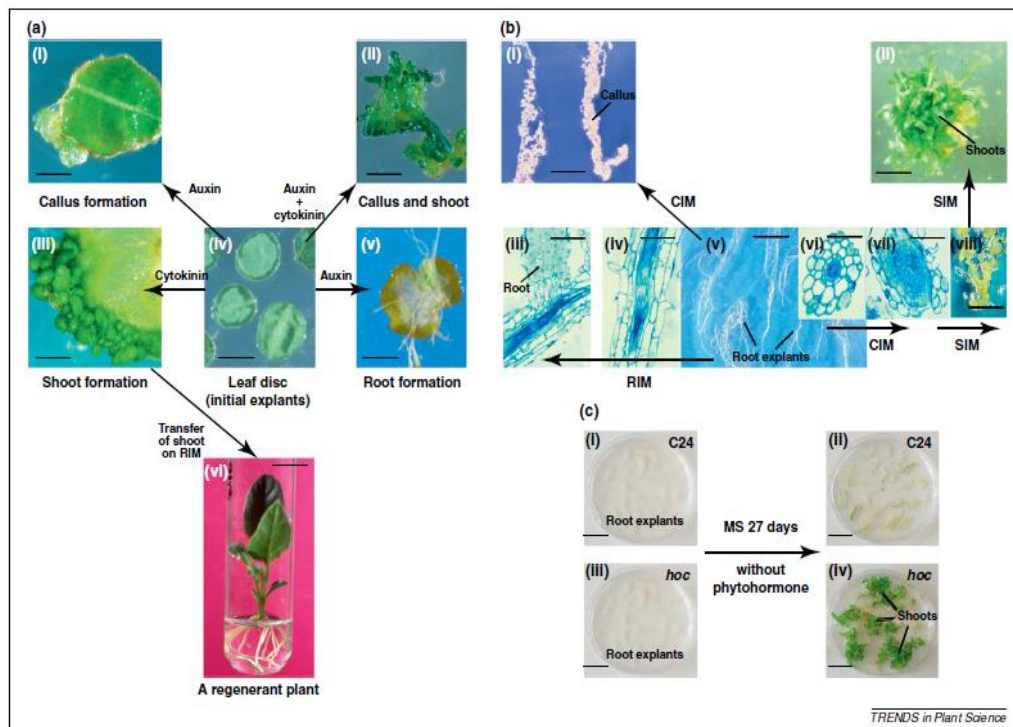


Figura 1. Efecto de fitohormonas en la producción de brotes y raíces para la regeneración de plantas. Regulación química para la formación de brotes, callo o raíz a partir de hojas de a) *Datura* (i, ii, iv-vi) y *Petunia* (iii) y b) explantes de *Arabidopsis* nativa (i-viii), las cuales crecen en dos tipos de medio con diferentes combinaciones y concentraciones de fitohormonas (CIM= medio inductor de callo y SIM= medio inductor de brotes), c) alta capacidad de regeneración brotes a partir de raíces como explantes en una mutante (*hoc*) (iii y iv) de *Arabidopsis thaliana* comparada con una nativa (C24) (i y ii) (Duclercq *et al.*, 2011).

Sin embargo, la respuesta que éstas inducen en el explante, están en función de la cantidad exacta requerida de fitohormonas, la combinación e interacción con otros reguladores, el tiempo de exposición del explante en el medio de cultivo (Yancheva *et al.*, 2003), tipo y tamaño del explante (D'Souza and Sharon, 2001), la especie establecida en cultivo de tejidos, ya que algunas

de ellas al no tener fitohormonas en el medio de cultivo son incapaces de generar brotes (Naik y Chand, 2003), mientras que otras tienen el potencial de inducir algún cambio morfológico en el explante, ya sea generando callo, raíces o brotes (axilares o adventicios); aunque la respuesta siempre será menor, comparada con aquellos medios que contienen algún(as) fitohormonas (Baisi *et al.*, 2000).

Desde los años 50's, se conoce que la relación de auxinas y citocininas era y es el factor principal en la organogénesis *in vitro*, se descubrió que a mayor cantidad de citocininas y menos auxinas se favorece la formación de brotes, que a mayor cantidad de auxinas y menos citocininas se favorece la formación de raíces y embriogénesis somática, y que a una relación 1:1 de auxinas y citocininas se favorece la formación de callo, aunque cabe mencionar que existen ocasiones en las que estos postulados no se cumplen (Skoog y Miller, 1957).

Dentro de las auxinas y citocininas más utilizadas para organogénesis están: el ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA) (Nandagopal and Ranjitha, 2006), 2-4 diclorofenoxiacético (2-4,D), bencil aminopurina (BAP o BA) (Baisi *et al.*, 2000), cinetina (6-furfurilaminopurina), zeatina, 2-isopenteniladenina (2iP) (D'Souza and Sharon, 2001).

Debido al uso de todos estos compuestos químicos y fitohormonas, en los últimos años, Kobayashi *et al.*, 2003; Tavano *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2011; se han reportado un gran número de casos exitosos de organogénesis en varias especies, utilizando diferentes explantes (segmentos de tallo u hojas).

Marques y colaboradores (2011) mencionan que al cultivar entrenudos basales de árboles de *Citrus aurantium* de 12 meses, en el medio descrito por

Duran-Vila *et al*, (1989) suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP, 50 g L⁻¹ de sacarosa, se logró la regeneración en 95% de los explantes formando en promedio 9 brotes por explante. Por lo que el uso de BAP en esta especie juego un papel muy importante para la obtención de brotes adventicios.

El medio de cultivo desarrollado por Duran-Vila y colaboradores (1989), es un medio elaborado a base de las sales MS, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0.2 mg L⁻¹ de tiamina HCl, 1 mg L⁻¹ de piridoxina HCl y 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico (el doble de la concentración de vitaminas del MS) y 30 g L⁻¹ de sacarosa. Se considera adecuado para la morfogénesis y cultivo de tejidos de cítricos. Utilizando este medio, suplementado con 10 mg L⁻¹ de ANA y 0.25 mg L⁻¹ de BAP y colocando los explantes de tres especies de cítricos (*C. sinensis*, *C. medica* y *C. aurantifolia*) en condiciones de oscuridad (segmentos internodales), estos autores lograron la inducción de callos en , promoviendo después la brotación con diferentes concentraciones de BAP (1 mg L⁻¹ de BAP para limón y 3 mg L⁻¹ de BAP para naranja dulce y citron). Los brotes obtenidos fueron enraizados con 3 mg L⁻¹ de ANA y elongados con 10 mg L⁻¹ de ANA para naranja y limón y 3 mg L⁻¹ de ANA para citron, logrando con ello un protocolo eficiente para la regeneración de tres especies de cítricos. Sin embargo al utilizar segmentos nodales, la concentración más eficiente fue de 1 mg L⁻¹ de BAP para las tres especies, ya que concentraciones más altas inhibían el crecimiento de los explantes.

El uso de explantes en los cuales no existe de manera natural el estímulo para la formación de brotes, como el caso de segmentos internodales en plantas leñosas, resulta más difícil la organogénesis de *novo*. No obstante, Curtis and Mirkov (2012) reportaron eventos exitosos, usando segmentos internodales de *Citrus sinensis*, donde el porcentaje de regeneración fue del 33.5% utilizando el surfactante Pluoronic F-68 al 0.001% (p/v) en el medio de cultivo MS suplementado con 20 mg L⁻¹ de K₂HPO₄, 2.5% de sacarosa, 0.1 mg

L⁻¹ de 2,4-D, 3 mg L⁻¹ de BAP, 1.5 mg L⁻¹ de extracto de malta, vitaminas de Gamborg y 0.02% de agua de coco. El efecto fue asociado al surfactante, dado que este agente tensoactivo tiene un punto hidrofóbico alto, es decir, tiene baja capacidad para interactuar con la fracción lipídica de las membranas celulares, lo cual permite estimular las células de los tallos de especies leñosas para regenerar brotes sin causar daños en la membrana plasmática, logrando el desarrollo de brotes sin alteraciones (Kumar *et al.*, 1992; Curtis and Mirkov, 2012).

En *C. volkameriana* y *C. aurantium* se desarrolló un protocolo de cultivo *in vitro* probando tres explantes (epicotilos, hipocotilos e internodales) utilizando el medio de Grosser and Gmitter (1990) suplementado con diferentes concentraciones de BAP e incubándolos en oscuridad por dos semanas y posteriormente en fotoperiodo. Se encontró que el mejor explante para la organogénesis fue el epicotilo independientemente de la concentración de BAP utilizada, sin embargo entre especies el mejor explante fue el hipocotilo, obteniendo 77% y 75% de brotes en *C. volkameriana* y *C. aurantium*, respectivamente. La concentración de BAP óptima fue diferente para cada especie 1 mg L⁻¹ para *C. volkameriana* y 0.5 mg L⁻¹ para *C. aurantium*, obteniendo con esto porcentajes de brotación de 42 y 59% respectivamente (Tavano *et al.*, 2009).

Naranja dulce por su gran importancia económica, es una excelente candidata a la técnica de cultivo *in vitro*. Por lo cual, Kobayashi y colaboradores (2003) desarrollaron una metodología para su propagación utilizando segmentos internodales de árboles de 1 año de edad cortados transversalmente. Estos se cultivaron en medio MS suplementado con 0.41 mg de BAP y 0.24 mg de AG₃, por dos semanas y en oscuridad. Ellos lograron un 54% de explantes con cuerpos adventicios de 1 mm, los cuales fueron transferidos posteriormente a medio para plantas leñosas suplementado con

0.41 mg de BAP y 0.24 mg de AG₃ por dos semanas para el desarrollo de los mismos (por las bajas concentraciones de nitrógeno y potasio), estos brotes fueron injertados en carrizo citrange y colocados en medio líquido para su elongación.

En segmentos nodales de árboles adultos de *Citrus aurantifolia* cultivados en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP, 1 mg L⁻¹ de cinetina y 1 mg L⁻¹ de ANA se logró obtener hasta 9 brotes por explante, con hojas de 25 mm de longitud. Mostrando con ello que la combinación de BAP y ANA son efectivos al momento de inducir brotación axilar, y que estas fitohormonas en exceso o bajas dosis inhiben la formación de brotes laterales. Al probar el efecto individual de ANA y BAP, encontraron que ANA induce la formación de un solo brote lateral, mientras que la presencia de BAP en el medio muestra un efecto significativo en la multiplicación de los brotes (Al-Bahrany, 2002).

Marutani-Hert y colaboradores (2011) desarrollaron un protocolo para inducir brotación y crecimiento de brotes a partir de segmentos nodales en tres especies de cítricos maduros (clamondin, toronja y naranja dulce). Encontraron que BAP incrementa el número de brotes, mientras que AIA mejora el desarrollo de éste. Observaron que había una defoliación en los brotes emergidos y encontraron que la presencia de AgNO₃ (2 mg L⁻¹) y el agente gelificante (0.2, 0.4 y 0.6%) en el medio de cultivo, reducían significativamente la caída de las hojas. Describen también que los factores para inducir brotación en los explantes y desarrollo de los mismos (sin problemas de defoliación) en estas especies era suplementando el medio con AgNO₃, Gelrite y AIA.

Burikam *et al.* (1988) desarrollaron un protocolo para la estandarización del cultivo *in vitro* de *Carica papaya*, en el cual utilizaron como explantes

brotos laterales y ápices, que al establecerlos en medio MS suplementado con 1.5 mg L⁻¹ de AIB y 0.2 mg L⁻¹ de BAP lograron formar brotes laterales. Sin embargo después de 1 año de subcultivos presentaron problemas de vitrificación, los cuales fueron solucionados al utilizar el medio MS suplementado con 15% de agua de coco, 0.1 mg L⁻¹ de ANA y 120 mg L⁻¹ de sulfato de adenina (compuesto capaz de revertir la vitrificación para esta especie). Con esta formulación nueva para el medio de cultivo se obtuvo hasta un 80% brotes viables para enraizamiento y aclimatización.

El establecimiento de Maracuya (*Passiflora edulis*) *in vitro*, permitió la organogénesis adventicia indirecta, a partir de segmentos internodales establecidos en medio MS y suplementado con BAP (1, 2, 3 y 4 mg L⁻¹). En todos los tratamientos hubo formación de callo, en ambos extremos del explante con la formación de cuerpos adventicios, sin embargo el mayor porcentaje de brotes se obtuvo en el medio suplementado con 1 a 2 mg L⁻¹ de BAP. Se encontró que a mayor concentración de BAP el explante no tiene la capacidad para dispersarse en el medio y desarrollar brotes (Biasi *et al.*, 2000).

Pérez-Tornero y colaboradores (2000) demostraron que al utilizar segmentos internodales y hojas de *Prunus armeniaca* L. como explante, y al cultivaron en un medio MS suplementado con 1.98 mg de thidiazuron (TDZ) y 0.5 mg de ANA se logra inducir hasta un 24.3% de regeneración, encontrando que el uso del TDZ es más eficiente que el uso de BAP para esta especie en particular.

Otros autores también reportan brotación adventicia en hojas de *Malus domestica* al utilizar medio MS suplementado con TDZ (5 mg L⁻¹) y 2,4-D (1 mg L⁻¹) por dos días (promoviendo una mayor división celular), seguido de un subcultivo a medio MS suplementado con TDZ (5 mg L⁻¹) y AIB (1 mg L⁻¹) por 33 días que activó la elongación celular y formación de puntos meristemáticos,

lográndose con ello hasta un 80% de regeneración de brotes adventicios (Yancheva *et al.*, 2003). Esto indica que existe una acción sinérgica entre ambas auxinas y el TDZ, así como una sincronización óptima para la diferenciación del tejido.

La granada (*Punica granatum* L.) es considerada como una de las especies más recalcitrantes en cultivo de tejidos; no obstante, se desarrolló un protocolo de regeneración, para el cual utilizaron cotiledones e hipocotilos que fueron colocados en medio MS suplementado con 2 mg de BAP, 1 mg de ANA y 10% de agua de coco. Se logró un porcentaje de regeneración del 23% en hipocotilos y 33% en cotiledones, en este último el porcentaje de brotes por explante era mayor (2.6 vs 2.2) así como la longitud de los mismos (2.5 vs 2.4). Los autores observaron que esta especie en un medio de cultivo libre de fitohormonas es incapaz de inducir brotación adventicia (Naik y Chand, 2003).

2.6.2 Efecto de precursores de reguladores de crecimiento (del tipo auxínico y citocinínico) en la inducción de brotes mediante organogénesis

Actualmente, existen nuevos compuestos o compuestos no tan comunes para inducir brotación, como el thidiazuron (TDZ), algunos metabolitos como la adenina (A) y el sulfato de adenina (SA), los cuales están reportados como compuestos químicos que actúa como una citocinina y son ampliamente utilizados por su alta eficiencia en la inducción de brotes adventicios en diferentes especies (Pérez-Tornero *et al.*, 2000; Yancheva *et al.*, 2003; Ramesh *et al.*, 2005). Además, de algunos otros compuestos que son considerados como reguladores de crecimiento (activadores de la división celular) tales como el triacontanol (TRIA), el cual es un promotor del crecimiento de las plantas de manera natural (Ries *et al.*, 1997) y es utilizado tanto en campo, con aspersiones que aumentan la productividad (Ries, 1985), como en cultivo de tejidos para micropropagación, embriogénesis somática y como productor de metabolitos secundarios (Parimalan *et al.*, 2009). Este compuesto es

considerado por algunos autores como un potente regulador del crecimiento (Malabadi *et al.*, 2005b; Verma *et al.*, 2011) ya que tiene la capacidad de actuar como un metabolito o mensajero secundario que se mueve rápidamente en el interior de las plantas influyendo de manera significativa en la producción de enzimas para el metabolismo de carbohidratos (Ries *et al.*, 1988) y procesos de crecimiento (Ries *et al.*, 1977). Otro compuesto utilizado para inducir brotes adventicios es el ácido 4-fluorofenoxiacético (4-FAA), se sabe que actúa como una auxina al ser comparado con el 2,4-D y al actuar de forma similar, aunque el mecanismo de acción en la planta aún se desconoce su efecto en la obtención de brotes adventicios está comprobado (Luo *et al.*, 2006).

Anteriormente, se mencionó que el uso de otros compuestos llegan a estimular la formación de brotes en diversas especies, tal es el caso de sulfato de adenina (SA), el cual a una concentración de 60 mg L⁻¹ combinado con 0.2 mg L⁻¹ de AIA y 1.5 mg L⁻¹ de BAP como suplemento en el medio de cultivo MS, pudo inducir 92% de regeneración en segmentos nodales (18 brotes por explante) de *Bacopa monnieri* (Linn.) Penn. Esta respuesta la atribuyen al sinergismo entre SA, BAP y AIA. Aunque concentraciones de SA a 80 y 100 mg L⁻¹, combinada con BAP y AIA no tiene efecto alguno en la inducción de brotes (Ramesh *et al.*, 2005).

Bantawa y colaboradores (2009) también utilizaron SA en el medio de cultivo para inducir brotación en *Picrorhiza scrophulariflora*, y encontraron con segmentos nodales cultivados en un medio MS suplementado con SA a una concentración de 100 mg L⁻¹ que se promovía la regeneración de hasta 28 brotes por explante.

Cichorium intybus L. cv. Focus fue establecida *in vitro* para formar callos en hojas jóvenes, los cuales se colocaron en medio MS y B5 suplementado con 0.5 mg de SA, 1.5 mg de BAP y 0.5 mg AIA dando un 93.6% de regeneración

de brotes adventicios (33.3 brotes por explante). En este trabajo se encontró que la presencia de SA en el medio de cultivo, aumentó el porcentaje de formación de callo (Nandagopal *et al.*, 2006).

Parimalan y colaboradores (2009) reportan que segmentos internodales de *Bixa orellana* cultivados en medio MS suplementado con 0.00876 mg de AIA, 1.99 mg de BAP y 4.91 mg de triacontanol, obtuvieron de 11 a 12 brotes por explante mediante organogénesis indirecta. Los autores hacen énfasis en el uso del triacontanol en combinación con AIA y BAP para inducir respuesta del explante, ya que de manera independiente la formación de brotes adventicios fue mínima (2 a 3 brotes por explante).

Malabadi y colaboradores (2005b), observaron que el triacontanol a una concentración de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ en medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) induce la formación de callos verdes con pequeñas estructuras en un alto porcentaje (92%) de rizomas de *Costus speciosus* a las tres semanas después de la siembra. A las 5 semanas se produjeron 18 brotes con 3 hojas, así como la formación de raíces en brotes con 2 a 3 hojas (86%) en el mismo medio pero suplementado con 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TRIA. Los autores encontraron que concentraciones arriba de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TRIA había un efecto inhibitorio en la formación de brotes y raíces, indicando entonces que se requieren de bajas concentraciones de este compuesto para la inducción de brotes y raíces en esta especie, mostrando la efectividad del compuesto como regulador de crecimiento en estas fases y la alta sensibilidad del explante ante la presencia del TRIA, el cual está altamente relacionado con procesos de crecimiento.

Otro caso exitoso del uso de TRIA se encontró con *Salvia officinalis L.*, en la cual utilizaron brotes provenientes de cultivo *in vitro* como explante, los cuales se colocaron en un medio MS suplementado con 0.1 mg L^{-1} AIA, 0.45 mg L^{-1} de BAP y TRIA a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$). La mejor

concentración de TRIA fue de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, concentración que produjo 6 brotes por explante en 5 semanas; concentraciones más altas o más bajas a $10 \mu\text{g}$ inhibían la formación de brotes; sin embargo, éstas fueron superiores al testigo (sin triacontanol). Algunos autores mencionan que se requiere usar TRIA en la fase de proliferación y en la de enraizamiento; no obstante para esta especie únicamente se utilizó en la etapa de proliferación, lo cual indica que este compuesto tiene un ligero efecto en la producción de brotes, atribuido no solamente a la capacidad que da a las células de un mayor almacenamiento de agua y un alargamiento celular, sino también al incremento en el número de células (Grzegorzczuk *et al.*, 2006).

El TRIA se ha utilizado en cacahuate (*Arachis hypogaea*), para promover organogénesis directa. Para el establecimiento de esta especie *in vitro* se utilizaron como explantes cotiledones de dos cultivares de cacahuates, los cuales se cultivaron en un medio MS suplementado con $0.5\text{-}2 \text{ mL L}^{-1}$ de Vipul (solución líquida de triacontanol) solo o combinado con BAP (3 mg L^{-1}). Para el cultivar M-13 la mejor respuesta fue con 2 mL L^{-1} de TRIA combinado con BAP (31.11 brotes por explante), mientras que para el cultivar PBS24030 fue 1 mL L^{-1} combinado con BAP (30.77 brotes por explante). La etapa de multiplicación tuvo una duración de 3-5 meses, mientras que la aparición de los primeros brotes se observaron desde los 30 días después del establecimiento. La formación de raíces se observó con la presencia de TRIA en el medio de cultivo de 1 mL L^{-1} para PBS24030 y de $0.5\text{-}2 \text{ mL L}^{-1}$ de M-13. Las plantas con raíces fueron aclimatadas a las condiciones de invernadero, indicando con ello que el TRIA es un potente regulador de crecimiento útil en varias etapas del cultivo *in vitro* (Verma *et al.*, 2011).

En especies leñosas, Tantos y colaboradores (2001) desarrollaron un protocolo de micropropagación en manzana y cereza en el cual utilizaban ápices y segmentos nodales como explantes, que eran establecidos en un medio

de cultivo MS suplementado con BAP (0.25-1 mg L⁻¹), AIB (0.5-1 mg L⁻¹) y triacontanol (2 a 20 µg L⁻¹) con la finalidad de incrementar el número de brotes en estas especies. En la fase de multiplicación (4 semanas) en manzana encontraron que la adición del TRIA (2 a 10 µg L⁻¹, respectivamente) incrementó significativamente el número de brotes axilares y el peso fresco (cuatro veces más comparado con el control); mientras que la etapa de enraizamiento requirió de dosis más altas (20 µg L⁻¹) y la presencia de AIB (1 mg L⁻¹) para aumentar el número y longitud de raíces. En el caso de cereza, el uso de TRIA en el medio de cultivo no tuvo un efecto significativo en la multiplicación de brotes (periodo de 4 semanas); sin embargo, para enraizamiento a una concentración de 2 µg L⁻¹ en combinación con AIB (0.5 mg L⁻¹) resultó altamente efectivo.

Malabadi y colaboradores (2005a) reportan, que para la propagación *in vitro* de algunas orquídeas (*Dendrobium nobile*) el uso de triacontanol a bajas concentraciones es una excelente opción para las fases de multiplicación y enraizamiento. Ellos utilizaron como explante secciones de tallo delgadas, las cuales se cultivaron en 1 a 30 µg L⁻¹ de TRIA en el medio reportado por Mitra y colaboradores (1976) y encontraron que tiene un alto potencial para inducir la formación de cuerpos parecidos a los protocormos (PLBs) (de 6 a 12 semanas para su formación). Para la proliferación de brotes a partir de callo (5-12 semanas para la obtención y desarrollo de brotes) y requeridos también en enraizamiento, señalan que para esta especie utilizando altas concentraciones de triacontanol o careciendo de él se inhibe la producciones de PLBs y que a bajas concentraciones (2, 4 o 7 µg L⁻¹) hay una gran respuesta por parte del explante con un crecimiento exuberante. La mejor concentración para brotación fue de 4 µg L⁻¹ con porcentajes de hasta 93%, 21 PLBs y 16 brotes, mientras que para enraizamiento fue de 2 µg L⁻¹ con 91% de explantes enraizados, después de 5 meses los brotes enraizados se transfirieron a macetas individuales.

El triacontanol, además de promover formación de brotes mediante la vía de organogénesis, también aumenta la tasa de multiplicación, incrementa el peso fresco, aumenta en el número y longitud de raíces, así como el contenido de clorofila, se le ha asociado también en la producción de metabolitos secundarios, además de inducir embriogénesis somática (Tantos *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001; Giridhar *et al.*, 2004; Malabadi *et al.*, 2005a y 2005b; Grzegorzcyk *et al.*, 2006; Parimalan *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2011). Es por ello que el uso de triacontanol en cultivo de tejidos es justificado, aun cuando en cítricos no existan trabajos donde se haya estudiado el efecto de este compuesto.

Otro compuesto que ha sido utilizado muy poco en cultivo de tejidos es el ácido-4-fluorofenoxiacético (4-FAA), el cual aunque se desconoce su mecanismo de acción se le ha asociado con la producción embriones, mediante la vía de embriogénesis somática. La mayoría de las especies en las que se ha reportado su aplicación en el medio de cultivo, han sido herbáceas, por lo que en el campo de los frutales y sobre todo en el cítricola se desconoce su efectividad.

En *Ipomea batatas*, se logró inducir desdiferenciación a partir de peciolas en medio MS suplementado con vitaminas como el pantotenato de calcio (2 mg L⁻¹). Para la organogénesis adventicia se utilizó el medio MS suplementado con 0.2 mg L⁻¹ 4-FAA por 6 días y 6 días más en medio MS suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de zeatina. La regeneración máxima fue de un 20%, logrando plántulas completas (Luo *et al.*, 2006).

El uso de 4FA, se ha utilizado en algunas otras especies entre ellas *Phragmites communis*, la cual es una planta utilizada para captar metales pesados y para la purificación natural de aguas contaminadas. Por eso se desarrolló un protocolo *in vitro* en donde se utilizaron segmentos internodales

como explantes, cultivados en un medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 3 g L⁻¹ de gelrite además de diferentes concentraciones (0-5 mg L⁻¹) de 2,4-D y 4-FA durante 6 semanas para inducir formación de callos, la mejor concentración de estas auxinas fue 0.5 y 1 µg L⁻¹ con porcentajes de 70% (2,4-D) - 93% (4-FA), sin embargo la calidad de los callos fue mejor con el uso de 2,4-D (callos friables, amarillos y grandes), aunque 4-FA tiene una mayor facilidad para inducir la formación de callos, debido a ello, se indujo la formación de callo usando 4-FA y subcultivándolos a un medio de cultivo con 2,4-D para hacerlos friables. Para la formación de brotes a partir de estos callos embriogénicos se utilizó una combinación de auxinas y citocininas, en las cuales se utilizó 2 mg L⁻¹ de BA y 0.05 ó 0.2 mg L⁻¹ de ANA formando hasta 10 brotes por callo, los cuales fueron colocados en medio líquido suplementado con 60 g L⁻¹ de sacarosa para un mejor desarrollo. Los brotes obtenidos fueron aclimatizados y trasladados en invernadero (Lee *et al.*, 2012).

El uso de 4-FAA en 22 cultivares de cebolla, ha sido muy exitosa debido a su acción auxínica, induciendo la formación de callo y regeneración de plántulas en medio MS suplementado con 50 µM de 4-FAA, combinada con 2iP y caseína hidrolizada, pero sin favorecer la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Tanikawa *et al.*, 1996; Tanikawa *et al.*, 1998; Kamata *et al.*, 2011).

Otra especie en la cual se ha probado el efecto de 4-FAA, fue en *Pharbitis nil* Choisy (campanilla japonesa), en la cual a una concentración de 1 mg L⁻¹, indujo la formación de callos embriogénicos (66.5%) (Otani y Shimada, 1998). Bajo la misma concentración de 4-FAA, Otani y colaboradores (1998) reportan que en camote también se logra la inducción de callos organogénicos.

Finalmente, otros compuestos como fungicidas y algunos antibióticos, también se han identificado como promotores de una respuesta morfogénica

con una acción sinérgica. Benlate (fungicida sistémico) al que se le atribuye una estructura química parecida a la de las citocininas, tiene la capacidad de regenerar brotes laterales y adventicios en conjunto con antibióticos tales como kanamicina, cefotaxima y trimetoprima lo cuales están reportados como promotores de brotación. Estos compuestos son capaces de provocar una respuesta morfogénica en el explante, ya que someten a las células a un estrés y selección, donde solamente las células competentes serán capaces de desarrollar brotes, además de disminuir la contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro*. Este efecto se ha observado en especies como *Bacopa monnieri*, *Mentha piperita* y *Solanum nigrum* (Tiwari *et al.*, 2006; Bantawa *et al.*, 2009; Sridhar and Naidu, 2011; Sujana and Naidu, 2011).

El uso de todos estos compuestos (fitohormonas, precursores de reguladores, activadores de división celular, antibióticos y fungicidas) se generan cambios a nivel anatómico en los explantes, modificando la estructura celular y provocando la morfogénesis en cualquiera de sus dos vías: embriogénesis u organogénesis directa o indirecta (formación de callo).

2.7 Anatomía y fisiología del tallo de los cítricos

Morfológicamente el tallo de dicotiledóneas es la estructura aérea de la planta, formado por nudos y entrenudos, que sirve de sostén a las hojas, flores y frutos y sirve para el transporte de fotosintatos. Está constituido por tres sistemas de tejidos: dérmico, vascular y fundamental.

2.7.1 Tejido dérmico.

El tejido dérmico está constituido por la epidermis. Este tejido proviene del protodermo y es el tejido que recubre toda la planta. La epidermis es un tejido compacto sin espacios intercelulares, complejo constituido por diferentes

tipos celulares (estomas, tricomas, pelos absorbentes, glándulas, y otras). Generalmente, es una sola capa de células tabulares, en contacto con el ambiente, contienen cutícula y material graso (cutina) sobre ellas, restringiendo con ello la transpiración. Además está relacionado con el intercambio gaseoso mediante los estomas presentes en él. La principal función de la epidermis es la de protección al ambiente (Esau, 1982).

2.7.2 Tejido vascular.

El tejido vascular conformado principalmente por xilema y floema, es uno de los tejidos más importantes de las plantas. El xilema y el floema son los principales tejidos de conducción de la planta. El xilema está compuesto de traqueidas, elementos de vaso, células de parénquima, fibras y esclereidas, cada una con funciones muy importantes. Las principales funciones de este tejido son la conducción de agua (traqueidas y elementos de vaso), almacenamiento (células parenquimáticas) y sostén de la planta (fibras y esclereidas). Por otro lado, el floema es un tejido que está constituido principalmente por células cribosas, elementos de los tubos cribosos, células acompañantes (parénquima), células parenquimáticas, fibras y esclereidas. Este tejido se especializa en la conducción y almacenamiento de fotosintatos además del sostén de la planta (fibras y esclereidas). El cambium es un meristemo lateral de crecimiento secundario que da origen a tejidos vasculares secundarios, originado del procambium y tejido interfascicular, en el caso del tallo. Es un tejido formado por células iniciales fusiformes e iniciales cortas, en este tejido predominan las divisiones tangenciales que dan origen a xilema secundario hacia el interior del tallo y al floema secundario hacia la región externa (Esau, 1982).

2.7.3 Tejido fundamental.

El tejido fundamental del tallo está constituido por el resto de los tejidos que no pertenecen al dérmico y al vascular. La corteza en un tallo es el tejido ubicado entre la epidermis y cilindro vascular, en el caso del crecimiento secundario la corteza abarca el tejido entre la epidermis y el cambium vascular. Generalmente está formado de células parenquimáticas y ocasionalmente forman espacios intercelulares. La médula se encuentra en la parte central del tallo, está formada por células de parénquima de diversos tamaños, encontrándose las más grandes en el centro en las cuales se forman espacios prominentes, mientras que las células de la periferia son pequeñas, compactas y más longevas. En ambos tejidos pueden encontrarse cristales. Estos tejidos al estar formados por células de parénquima tienen diversas funciones como la cicatrización de heridas, regeneración, formación de brotes adventicios, unión de injertos, entre otras (Esau, 1982).

2.8 Alteraciones histológicas en cítricos ocasionadas por el efecto de reguladores de crecimiento.

Existen pocos estudios acerca de las modificaciones estructurales causadas por los reguladores de crecimiento en cítricos, sin embargo en especies como *Citrus sinensis* y Carrizo citrange se han estudiado los cambios en los tejidos del explantes por efecto de las auxinas y citocininas.

Un estudio histológico en cuatro cultivares de *Citrus sinensis* para encontrar la ontogenia del proceso morfológico con la finalidad de aumentar la eficiencia de transformación genética, fue realizado utilizando segmentos internodales y hojas (Almeida et al., 2003). Los resultados obtenidos, permitieron observar que la mejor respuesta morfogénica fue al utilizar segmentos internodales en los cuatro cultivares, bajo condiciones de oscuridad (organogénesis indirecta), contenidas en un medio MS suplementado con bajas concentraciones de BAP y ANA, provocando la formación de callo. Se

compararon las modificaciones en la epidermis, corteza y tamaño de glándulas oleaginosas entre los tratamientos y el testigo. Los cambios anatómicos registrados a partir del día 15 mostraron una activa división celular en la región del cambium la cual incrementó el diámetro del explante, se observó también la formación de grupos de células meristemáticas, los brotes adventicios fueron observados hasta los 30 días. En los cuatro cultivares se indujo la formación de brotes adventicios (Almeida *et al.*, 2003).

En Carrizo citrange (*Citrus sinensis* X *Pomcirus trifoliata*) al probar diferentes medios de cultivo, se encontró que un medio rico en auxinas promovía formación de callo, el cual era originado a partir del cambium y daba origen a varias capas por encima de la superficie del corte, que dieron paso a divisiones periclinales para formar un callo que sería visible macroscópicamente a los 14 días del establecimiento. El callo fue de mayor tamaño cuando los explantes se colocaron de manera invertida en el medio de cultivo (con el ápice en contacto con el medio), debido a que en la parte basal del explante se encontró un mayor número de núcleos en fase S (duplicación del ADN), la cual se requiere para la obtención de buenos resultados en transformación mediada por *Agrobacterium*. Al mismo tiempo se logró identificar la formación de células meristemáticas (células pequeñas, isodiamétricas, con citoplasma denso, núcleo prominente y alta actividad mitótica), los cuales dieron origen a la formación de brotes adventicios a las cuatro semanas de cultivadas en el medio de regeneración (el cual contenía BAP). Lo trascendental de este trabajo fue el origen del callo (cambium) y la relación que existe entre las células competentes con una eficiente transformación, ya que ambas células (las que forman el callo y las competentes para transformación genética) provienen del mismo tejido (callo) (Peña *et al.*, 2004).

Por otra parte, en *Citrus sinensis* se observaron cambios en la morfología del explante (segmentos de epicotilo) cuando se expusieron al medio MS suplementado con BAP, dichos cambios se registraron a los 5 días después del establecimiento muy cerca de la zona del corte, ocurriendo principalmente en el cambium. Hubo un aumento en el número de capas de células debido a las divisiones periclinales de las células originales, aumentando la circunferencia del explante, la epidermis presentó rupturas especialmente en la región cercana al corte del explante, mientras que la corteza y médula se mantuvieron sin alteraciones. A los 10 días los cambios se intensificaron, el cambium tuvo un engrosamiento más pronunciado como consecuencia principalmente de las divisiones periclinales (también se observaron divisiones anticlinales y oblicuas), las células de la corteza tuvieron actividad mitótica, se observó una distribución celular desorganizada y espacios intercelulares distribuidos de manera irregular. La formación de regiones meristemáticas fueron visibles a los 15 días en la zona del cambium, las cuales desarrollaron en brotes adventicios a los 20 días, lo que provocó una desintegración de la epidermis, para dar origen a la yema preformada (Almeida *et al.*, 2006).

Tavano y colaboradores (2009) utilizando segmentos internodales, epicotilos e hipocotilos de *Citrus sinensis* establecidos en medio MS con diferentes concentraciones de BAP, encontraron que a los 10 días de estar en contacto con el medio de cultivo los segmentos internodales y epicotilos mostraban alteración en las células del cambium provocadas por divisiones periclinales, las cuales dieron origen a un callo formado de células parenquimáticas. Regiones meristemáticas se observaron a los 20-30 días después del establecimiento y dieron origen a brotes adventicios. En hipocotilos la regeneración únicamente se dio en esta región y no cerca del cotiledón; sin embargo, no indujo formación de brotes adventicios. Debido a ello al igual que en otras investigaciones, los segmentos internodales y epicotilos son los explantes utilizados exitosamente para la formación de brotes adventicios.

Algunos otros factores que influyen en la morfogénesis de epicotilos es la orientación del explante, tal y como lo menciona García-Luis y colaboradores (1999) al establecer *in vitro* epicotilos de Troyer citrange, donde se observó que al colocar verticalmente los explantes con la base introducida en el medio de cultivo (suplementado con BAP y ANA), favorecía la formación de callo y brotes adventicios en ambos extremos. Los cuerpos adventicios fueron formados desde los 5 días en contacto con el medio en el ápice, observándose divisiones periclinales en la zona del cambium (mayormente en la zona basal) formando callo. A los 9 días se identificaron estructuras meristemáticas con citoplasma denso, núcleo prominente, que dieron origen a estructuras globulares en la parte basal del explante, los brotes adventicios aparecieron hasta los 45 días con una longitud de hasta 16 μm , la cual fue incrementando mediante divisiones periclinales en el cambium vascular. Cabe resaltar que el uso de hormona (citocininas) fue crítico para la formación de callo y diferenciación de brotes, independientemente de la posición del explante.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo está conformado de dos etapas: 1) establecimiento *in vitro* de limón persa (*C. latifolia*) y 2) evaluación histológica de la respuesta del explante bajo la acción de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular.

3.1 ETAPA 1: Establecimiento *in vitro* de limón persa (*C. latifolia*).

3.1.1 Material vegetal.

Se establecieron *in vitro* segmentos nodales e internodales de varetas jóvenes de limón persa de árboles adultos provenientes de los huertos ubicados en Santiago Ixcuintla, Nayarit (21°48'41"N 105°12'24"O), Martínez de la Torre, Veracruz (20°04'N 97°04'O) y Mocochará, Yucatán (21°06'20"N 89°27'05"O).

3.1.2 Establecimiento *in vitro*.

Una vez que se colectaron las varetas en campo se les retiraron las hojas y se envolvieron en papel periódico húmedo, se introdujeron en bolsas y se transportaron en cajas de cartón o hieleras de unicel al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Fruticultura en el Colegio de Postgraduados.

3.1.3 Desinfestación del material vegetal.

Después del traslado (2 a 4 días) se efectuó la desinfestación de las varetas; se lavaron dos veces con abundante jabón antibacterial líquido y se cepillaron (cepillo de dientes de cerdas suaves). Luego fueron enjuagados bajo el chorro de agua del grifo. Las varetas se colocaron en un recipiente que contenía 1 mL L⁻¹ PPM (Preservative for Plant Tissue Culture Media) y se

probaron diferentes concentraciones, tiempos y tipos de bactericidas y fungicidas (Captan[®], Ridomil Gold[®], Agry-Gent Plus[®] (0.5 y 1 g L⁻¹) y Kasumin (1 y 2 mL L⁻¹) por 2, 6 y 12 h) (Cuadro 1). Transcurrido el tiempo se eliminó la solución y con tijeras de podar se cortaron fragmentos de aproximadamente 10 cm, se colocaron en frascos tipo gerber, y se procedió a la desinfestación con etanol (70%) durante 5 minutos a 250 rpm en un agitador electrónico (LAB-LINE modelo 4626), al finalizar los 5 minutos se probaron diferentes concentraciones del blanqueador comercial CLORALEX[®] (10, 20 y 40%) a diversos tiempos (5, 10 y 20 min) en agitación constante (250 rpm) y finalmente en la campana de flujo laminar (ESCO) se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Se establecieron 9 experimentos, 10-20 tratamientos, 20 repeticiones por tratamiento, teniendo como unidad experimental un explante (segmento internodal).

Cuadro 1. Tratamientos de desinfestación para el establecimiento de varetas de limón persa.

Trat	Estado	Descripción
1	Nayarit	Kas (2 mL L ⁻¹) por 3h, Kas (2 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20 y 40% por 15 min
2	Nayarit	Kas (2 mL L ⁻¹) por 3h, Kas (2 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20 y 40% por 20 min
3	Nayarit	Kas (2 mL L ⁻¹) 3 h, Kas (2 mL L ⁻¹) 5 min, etanol 70% 3 min, cloro 10, 20% 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
4	Veracruz	Kas (2 mL L ⁻¹) por 3 h, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
5	Nayarit	Kas (1 mL L ⁻¹) por 12 h, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20% por 15 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
6	Yucatán	Kas (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹) por 12 h, Kas (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹), Kas (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹).
7	Nayarit	Kas (1 mL L ⁻¹) 12 h, Kas (1 mL L ⁻¹) ó PPM (1 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹), Kas (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹).
8	Veracruz	Kas (1 mL L ⁻¹) 12 h, Kas (1 mL L ⁻¹) ó PPM (1 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
9	Yucatán	Kas (1 mL L ⁻¹) y Agry-Gent (0.5 g L ⁻¹) 12 h, Kas (1 mL L ⁻¹), PPM (1 mL L ⁻¹) y Agry-Gent por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).

Trat: tratamientos; Kas: Kasumin; PPM: Preservative for Plant Tissue Culture Media.

3.1.4 Medios de cultivo.

Se probaron diferentes componentes del medio de cultivo tanto para la fase de adaptación como para la inducción de brotes adventicios. El medio base utilizado para el establecimiento fue el MS (Murashige & Skoog, 1962) (tiamina HCl 2 mg L⁻¹, piridoxina HCl 2 mg L⁻¹, glicina 0.4 mg L⁻¹, ácido nicotínico 1 mg L⁻¹ y mio-inositol 100 mg L⁻¹). Este medio fue modificado en la etapa de inducción de brotes adventicios, ya que se le adicionó bencilaminopurina (BA o BAP) (1, 2 y 4 mg L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (0.5 mg L⁻¹), ácido naftalenacético (ANA) (0.5 mg L⁻¹), así como algunos precursores de fitohormonas y activadores de división celular como el triacontanol (4.9 mg L⁻¹) (Parimalan *et al.*, 2009), ácido-4-fluorofenoxiacético (4-FAA) (0.2 mg L⁻¹) (Luo *et al.*, 2006), adenina y sulfato de adenina (80-100 mg L⁻¹) (Bantawa *et al.*, 2009; Nandagopal y Ranjita, 2006). Tanto el medio utilizado en el establecimiento como el de inducción de brotes fueron suplementado con 5 mg L⁻¹ pantotenato de calcio (Luo *et al.*, 2006) y 1 mg L⁻¹ de PPM, 3% de sacarosa y 0.7% de agar-agar (MERCK) (Anexo I); el pH fue ajustando a 5.7 con hidróxido sodio 1M. Se dosificaron 10 ml del medio en tubos de ensaye de 18X150 mm y se esterilizaron en autoclave a 121°C 1.5 kg/cm² de presión durante 18 minutos.

Después de la desinfestación, segmentos nodales e internodales de 1-2 cm se sembraron de manera individual en tubos de ensaye con medio de cultivo y se mantuvieron en el cuarto de incubación a una temperatura de 30 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 h. luz.

3.1.5 Efecto de diferentes compuestos (fitohormonas, precursores de fitohormonas y activadores de división celular) en el medio de cultivo para la inducción de brotes adventicios.

En esta etapa se desarrollaron tres experimentos, donde se probaron combinaciones de auxinas, citocininas, precursores de fitohormonas del tipo citocínico (adenina y sulfato de adenina) y auxínico (ácido 4-fluorofenoxiacético) y activadores de la división celular (triacontanol) para inducir brotación adventicia a partir de segmentos internodales.

3.1.5.1 Experimento 1. Uso de citocininas (BAP) para la inducción de brotes adventicios.

Se usaron explantes (nodales e internodales) previamente establecidos *in vitro*, donde se probaron tres concentraciones (1, 2 y 4 mg L⁻¹) de BA y un control (medio MS).

3.1.5.2. Experimento 2. Uso de BAP combinado con AIA y ANA para inducción de brotes adventicios.

Posteriormente se probaron nuevamente las concentraciones de BAP solas y combinadas con 0.5 mg L⁻¹ de ANA o AIA, además de un testigo (medio MS). Dando un total de 24 tratamientos con 11 a 17 repeticiones por tratamiento (ya que estaba influenciado por el número de segmentos nodales e internodales asépticos obtenidos de la etapa de desinfestación) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Inducción de brotes adventicios con diferentes concentraciones de BAP, AIA y ANA.

Tratamiento	Descripción	Explante	Repeticiones
1	1 mg L ⁻¹ de BA	Nodales	14
2	2 mg L ⁻¹ de BA	Nodales	13
3	4 mg L ⁻¹ de BA	Nodales	14
4	Testigo	Nodales	15
5	1 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Nodales	14
6	2 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Nodales	14
7	4 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Nodales	12
8	0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Nodales	14
9	1 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Nodales	12
10	2 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Nodales	13
11	4 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Nodales	11
12	0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Nodales	11
13	1 mg L ⁻¹ de BA	Internodales	17
14	2 mg L ⁻¹ de BA	Internodales	15
15	4 mg L ⁻¹ de BA	Internodales	15
16	Testigo	Internodales	15
17	1 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Internodales	15
18	2 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Internodales	14
19	4 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Internodales	13
20	0.5 mg L ⁻¹ de ANA	Internodales	14
21	1 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Internodales	16
22	2 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Internodales	13
23	4 mg L ⁻¹ de BA + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Internodales	11
24	0.5 mg L ⁻¹ de AIA	Internodales	13

3.1.5.3 Experimento 3. Uso de nitrato de plata como control de defoliación in vitro y AG3 para elongación de brotes axilares.

Para el caso de los segmentos nodales establecidos en los experimentos 1 y 2, se identificaron brotes axilares cuyo tamaño era inferior a 0.5 cm de longitud y en forma de “roseta” mientras que los brotes que se elongaron más presentaron problemas de defoliación. Este experimento consistió en subcultivar los explantes pequeños y arrocetados a un medio que contenía 1.5 mg L⁻¹ de AG₃, con la finalidad de que se elongaran; en aquellos casos donde el explante era menor a 0.1 cm, se conservó parte del explante original. Los explantes con problemas de defoliación, fueron subcultivados a un medio suplementado con 2.5 mg L⁻¹ de nitrato de plata. El número de repeticiones

correspondientes al tratamiento con nitrato de plata fue de 21 explantes nodales con brotes axilares de una longitud de 2-3 cm y de 400 explantes nodales con brotes axilares menores a 0.5 cm para el tratamiento con AG₃.

3.1.5.4 Experimento 4. Uso de precursores de reguladores del tipo de las citocininas (adenina y sulfato de adenina) para la inducción de brotes adventicios.

En este experimento se utilizó un medio MS suplementado con sulfato de adenina y adenina (80 mg L⁻¹) combinados con 0.5 mg L⁻¹ de BA, para inducir brotes adventicios en 101 segmentos internodales, se modificó la posición del explante en el medio de cultivo, quedando la parte apical del explante en contacto con el medio. El número de repeticiones por tratamiento fue de 82 para sulfato de adenina y 86 para adenina.

3.1.5.5 Experimento 5. Uso de precursores de reguladores (adenina, sulfato de adenina y 4-FAA) y activadores de división celular (triacontanol) para la inducción de brotes adventicios.

En este experimento se aumentó la dosis de sulfato de adenina y adenina a 100 mg L⁻¹, además de usar un precursor de regulador del tipo auxínico (4-FAA) a una concentración de 0.2 mg L⁻¹ y un activador de división celular (triacontanol) a una concentración de 4.9 mg L⁻¹ en combinación con BA (2 mg L⁻¹) y AIA (0.0089 mg L⁻¹). En esta última fase se realizaron dos experimentos, en los cuales se evaluaron 4 tratamientos (sulfato de adenina, adenina, triacontanol y 4-FAA) con 100 repeticiones (explantes internodales) por tratamiento donde la unidad experimental constó en 1 explante internodal.

3.2 ETAPA 2: Estudio histológico en explantes de cítricos establecidos *in vitro* para evaluar el efecto de precursores de fitohormonas y activadores de división celular.

En el último experimento de brotación se realizó un análisis histológico para observar e identificar los cambios ocurridos a nivel celular y tisular por efecto de los diferentes precursores de fitohormonas en segmentos internodales de limón persa.

3.2.1 Establecimiento de los experimentos y muestreo del material vegetal.

Para a etapa (estudio histológico) se realizaron 2 experimentos, los cuales se establecieron en el mes de marzo con varetas provenientes de Nayarit (Santiago Ixcuintla) y otro en el mes de abril con varetas provenientes de Veracruz (Martínez de la Torre). Se utilizaron como explantes para el establecimiento *in vitro* segmentos internodales de varetas jóvenes de limón persa de árboles adultos provenientes de campo.

Después de lavar las varetas con agua y detergente, antes de la desinfección del material vegetal, se seleccionaron tres varetas de los cuales se tomaron tres segmentos internodales correspondientes a la fecha 0 (testigo), posteriormente cada 10 días después del establecimiento *in vitro* se tomaron muestras, teniendo un total de 4 muestreos (fecha 0, 10, 20, 30) con tres repeticiones cada uno, para cada tratamiento (4-FAA, triacontanol, sulfato de adenina y adenina) por experimento (Nayarit y Veracruz).

3.2.2 Histología de segmentos internodales de limón persa.

Por cada uno de los muestreos realizados, se obtuvieron fragmentos de segmentos internodales de aproximadamente 1 cm de longitud, los cuales fueron cortados longitudinalmente con una navaja tipo Gillette, se colocaron en

canastillas de plástico previamente etiquetadas y se fijaron en FAA (10% de formaldehído al 37%, 50% de etanol, 5% de ácido acético glacial y 35% de agua). El material fijado se lavó con agua corriente, posteriormente se deshidrató mediante una serie gradual de etanol y xileno, una vez deshidratado se incluyó en parafina y se realizaron cortes transversales y longitudinales de 15 μm con un micrótopo rotatorio (American Optical modelo 820). Los cortes se tiñeron con safranina "O" salina (0.05% de safranina "O", 2% de NaCl y agua) y verde fijo FCF (0.12% de verde fijo FCF en etanol 95%) de acuerdo al protocolo modificado de Rangel-Fajardo *et al.* (2012).

3.2.3 Variables evaluadas.

Se realizaron un promedio de 32 cortes por explante y en algunos casos de 50-60 para poder evaluar la variable deseada, sobre todo para aquellos casos en los cuales el callo fue alto (por encima de 300 μm). De cada muestra se originaron dos preparaciones con 8 cortes cada una, se evaluaron cortes discontinuos (no seriados) identificados como corte 3, 7, 11 y 15, con la finalidad de analizar células y/o tejidos diferentes. De cada uno de los cortes se observaron y analizaron dos campos visuales teniendo dos fotografías por corte y ocho observaciones por muestra. Para aquellas variables donde se evaluaron tejidos (xilema, floema, corteza y callo) se tomó una sola medida de cada campo visual, mientras que para aquellas evaluaciones a nivel celular como el diámetro de células de xilema, corteza y médula, se tomaron tres medidas por campo visual, dando un total de 24 mediciones. En total se evaluaron 14 variables en dos experimentos, 480 cortes y 960 campos visuales empleando un microscopio Axioscop 2 plus con una cámara Axicam 5 Mrc (Carl Zeiss, Germany) y el programa AxioVision 4.3 (Carl Zeiss, Germany) para el análisis de las imágenes.

Las variables evaluadas en los cortes transversales fueron: (Figura 2):

1. Ancho de xilema secundario interfascicular (AXIF): medida desde cambium vascular hasta el elemento traqueal más interno de la región interfascicular
2. Ancho de xilema fascicular (primario + secundario) (AXF): medida desde cambium vascular hasta el elemento traqueal más interno del xilema primario.
3. Número de elementos traqueales en xilema fascicular (TXF): medidas desde cambium vascular hasta el último elemento traqueal en la zona vascular.
4. Ancho de floema (AF): desde las fibras de floema primario hasta cambium vascular.
5. Ancho de corteza externa (AC): medida desde la epidermis hasta las fibras de floema primario.
6. Diámetro de elementos traqueales de xilema fascicular (DTXF): células de vasos seleccionadas al azar.
7. Diámetro de células de corteza (DCC): células de parénquima seleccionadas al azar en la zona media de la corteza.
8. Diámetro de células de médula (DCM): células de médula seleccionadas al azar en la zona próxima al xilema.
9. Brotos adventicios (variable cualitativa) (BA): identificación de meristemo y trazas foliares en la periferia del corte.

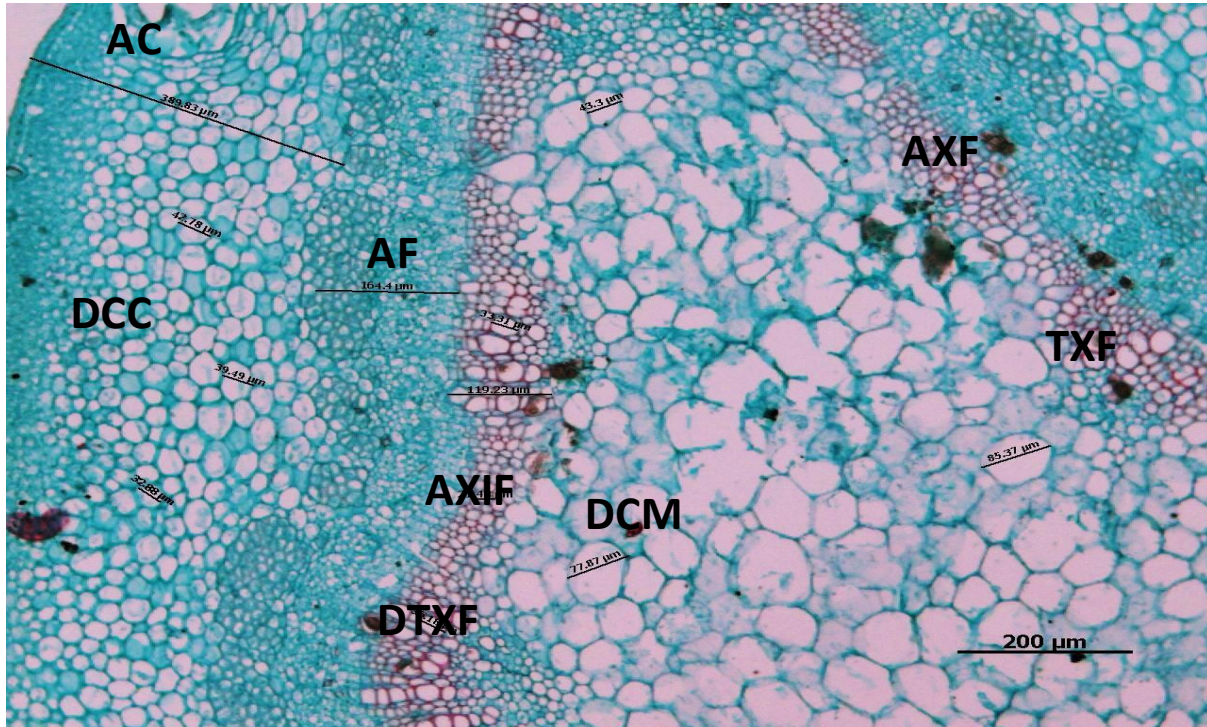


Figura 2. Corte transversal de un segmento internodal de limón persa (control).

Variables evaluadas en cortes longitudinales (Figura 3):

1. Ancho de corteza (AC): medida desde la epidermis hasta floema, en la parte superior del corte.
2. Índice de dilatación del cambium y floema (DCF): medida desde el cambium a las fibras de floema en la parte distal del explante.
3. Alto de callo (AlCa): tejido que sobresale del explante, el cual fue medido desde la superficie del corte hasta el punto más alto del callo.
4. Regiones meristemáticas (RM): conjunto de células pequeñas agrupadas con alta actividad mitótica, con núcleos prominentes y citoplasma denso.
5. Meristemos en fila (variable cualitativa) (MF): células en fila resultado de divisiones perpendiculares al eje longitudinal del explante.

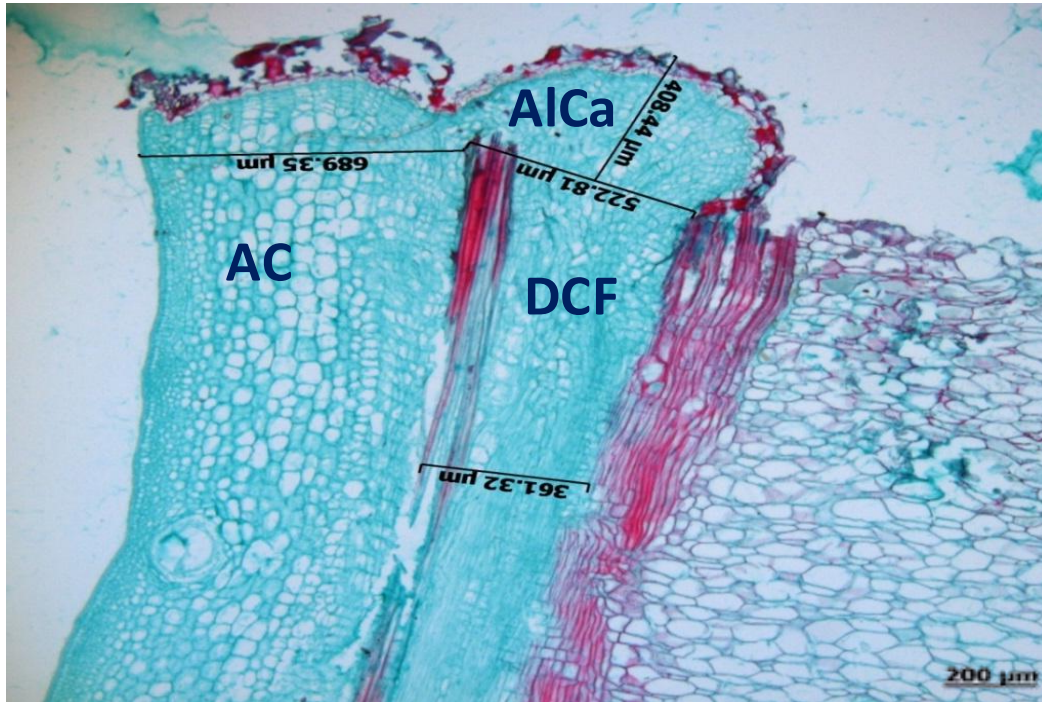


Figura 3. Corte longitudinal de segmento internodal establecido en 4-FAA.

3.3 Análisis estadístico para variables cuantitativas del estudio histológico.

Debido a que los explantes eran de diámetros variables, las variables medidas (excepto altura de callo y puntos meristemáticos) se expresaron en términos relativos para reducir el efecto en la varianza. Con la finalidad de estandarizar los datos para disminuir la variabilidad y asociar los cambios al efecto del compuesto utilizado, en cada variable se eliminaron valores máximos y mínimos, los datos restantes (expresados en μm) se dividieron entre el $\frac{1}{4}$ del diámetro del explante (μm), ya que fue el estimador del área evaluada, con esto, los resultados (gráficos) fueron expresados en términos relativos, por ejemplo:

$$\text{Ancho relativo de corteza} = \frac{\text{ancho de corteza-AC } (\mu\text{m})}{\frac{1}{4} \text{ del diámetro del explante } (\mu\text{m})}$$

El índice de dilatación fue calculado dividiendo DCF distal entre DCF basal. Posteriormente se promediaron los valores de todas las variables y se analizaron con el paquete estadístico SAS System versión 9.0 bajo un diseño experimental completamente al azar mediante un análisis de varianza ANOVA.

Para la comparación de medias se usaron las siguientes pruebas: a) pruebas de T con un $\alpha=0.1$, la cual al ser una de las pruebas más flexibles estadísticamente, puede identificar a más de un tratamiento como el mejor, aun con diferencias mínimas entre tratamientos (Anexo II); b) Tukey con un $\alpha=0.05$, ya que es una de las pruebas más estrictas estadísticamente y tiende a identificar de manera más precisa a los mejores tratamientos en una variable dada (Anexo III); y c) áreas bajo la curva (ABC) con un $\alpha=0.05$, una prueba poco usada en investigaciones de cultivo de tejidos, pero cuya finalidad fue la de identificar los mejores tratamientos en una variable, analizando la respuesta de ésta a través del tiempo (diferentes fechas de evaluación) (Anexo IV). Además se realizó un análisis de correlación de variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson en las variables de ancho de floema, índice de dilatación del tejido vascular, altura de callo y formación de regiones meristemáticas.

Para explicar los resultados obtenidos en el estudio de anatomía ante el efecto de los cuatro compuestos para inducir morfogénesis en segmentos internodales de limón persa, se utilizó la prueba de medias de Tukey para casi todas las variables, excepto para regiones meristem dado que es una prueba cuyos resultados son de alta confiabilidad estadística.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Establecimiento in vitro de limón persa (*C. latifolia*)

4.1.1 Desinfestación

El tiempo de exposición de 3 h con el bactericida Kasumin a 2 mL L⁻¹, en los experimentos 1-4 produjo una mortandad de 0-23% (Figura 4A) y un porcentaje de contaminación alto (30-89%) (Cuadro 3).

Algunos autores mencionan que la exposición de los explantes al cloro durante 20 minutos ayuda a la obtención de explantes asépticos (Pérez-Tornero *et al.*, 2010; Curtis and Mirkov, 2012; Tallón *et al.*, 2012); motivo por el cual se decidió aumentar el tiempo de exposición al cloro de 15 a 20 minutos, el efecto del tiempo se vio reflejado en la reducción de la cantidad de explantes muertos (0%) y un poco el de contaminación (35%). Al no observarse alguna diferencia en los tratamientos donde se hacía uso del cloro al 40% con respecto a las otras concentraciones (10 y 20%) se decidió eliminarla.

Al realizar el tratamiento 5 con varetas procedentes de Nayarit bajo el procedimiento descrito en el Cuadro 1 y con el antecedente de altos porcentajes de contaminación (hasta un 80%) (Figura 4B), se decidió aumentar la exposición de los explantes en Kasumin® por 12 h. a 1 mL L⁻¹ e incluir el uso de PPM en el medio de cultivo. Con esta modificación el porcentaje de contaminación redujo considerablemente respecto a los últimos resultados (35.5%).

Cuadro 3. Porcentaje de contaminación (%C) y mortandad (%M) en diferentes experimentos de desinfestación para el establecimiento de explantes (diferente origen de procedencia) in vitro.

Exp	#explante	% C	% M	Estado	Descripción
1	280	37.14 %	4.29 %	Nayarit	Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 3h, Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20 y 40% por 15 min.
2	280	35.71%	0.00 %	Nayarit	Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 3h, Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10, 20 y 40% por 20 min.
3	400	63.00%	23.00%	Nayarit	Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 3 h, Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10 y 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
4	300	88.33%	8.33%	Veracruz	Kasumin (2 mL L ⁻¹) por 3 h, etanol 70% por 3 min, cloro 10 y 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
5	200	35.50%	29.50%	Nayarit	Kasumin (1 mL L ⁻¹) por 12 h, etanol 70% por 3 min, cloro 10 y 20% por 15 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
6	200	80.00%	12.00%	Yucatán	Kasumin (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹) por 12 h, Kasumin (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10 y 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹), kasumin (1 mL L ⁻¹) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹).
7	200	47.00%	10.50%	Nayarit	Kasumin (1 mL L ⁻¹) 12 h, Kasumin (1 mL L ⁻¹) ó PPM (1 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10 y 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹), kasumin (1 mL L ⁻¹)

					1) y Ridomil (0.5 g L ⁻¹).
8	400	49.25%	2.00%	Veracruz	Kasumin (1 mL L ⁻¹) 12 h, Kasumin (1 mL L ⁻¹) ó PPM (1 mL L ⁻¹) por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 10 y 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).
9	120	68.33%	4.17%	Yucatán	Kasumin (1 mL L ⁻¹) y Agry-Gent (0.5 g L ⁻¹) 12 h, Kasumin (1 mL L ⁻¹), PPM (1 mL L ⁻¹) y Agry-Gent por 5 min, etanol 70% por 3 min, cloro 20% por 20 min, medio con PPM (1 mL L ⁻¹).

Para reducir la contaminación de los explantes en los siguientes experimentos (6-9) se probó un fungicida (Ridomil Gold®) en conjunto con el Kasumin®, además de PPM en solución por 12 h. para la desinfestación, al igual que el uso de estos (Ridomil® y Kasumin®) en el medio de cultivo. El porcentaje de contaminación (Figura 4C) fue alto, sobre todo en aquellos explantes que provenían del estado de Yucatán (80 y 68%); el uso del bactericida y fungicida en el medio de cultivo no disminuyó la contaminación de los explantes de manera significativa (47%) y el uso del PPM tuvo el mismo efecto que el kasumin. Estos resultados confirman lo obtenido por Niedz y Bausher (2002), quienes encontraron que el uso de PPM en el medio de cultivo disminuía los contaminantes al utilizar explantes de cítricos que provenían de campo o en condiciones de invernadero. Considerando los resultados obtenidos, se decidió usar en la solución de desinfestación, kasumin (bactericida y fungicida), Agry-Gent (bactericida) y PPM (evita el crecimiento de hongos y bacterias).

El uso de fungicidas y bactericidas para la desinfestación de material vegetal o como parte del medio de cultivo, solos o combinados con algunos antibióticos o reguladores en bajas dosis, se ha reportado en diferentes especies (*Picrorhiza sirophilariflora*, *Mentha piperita*, *Bacopa monnieri* y *Solanum nigrum*), teniendo buenos resultados en cuanto a explantes libres de contaminantes y atribuyendo en algunos casos un efecto inductor de brotes axilares y/o adventicios por parte de los fungicidas y antibióticos. Dicho efecto se atribuye a la similitud de estructura química y por tanto del modo de acción del fungicida (Benlate) con el de las citocininas, adenina y aquellos reguladores provenientes de adenina. En el caso de los antibióticos, su efecto se debe al estrés al que se somete a las células del explante cuando están en contacto con el medio permitiendo que únicamente células competentes sean capaces de sobrevivir y desarrollar brotes (Tiwari *et al.*, 2006; Bantawa *et al.*, 2009; Sridhar y Naidu, 2011; Sujana y Naidu, 2011).

A partir del experimento 3 el uso de las concentraciones de 10% y 20% de cloro, no se vio reflejada en los resultados con alguna tendencia, sin embargo se decidió usar la concentración de cloro al 20% ya que era una concentración intermedia y causaba menos daño en los explantes, lo cual concuerda con lo observado por otros autores (Tavano *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2010; Pérez-Tornero *et al.*, 2010; Curtis and Mirkov, 2012; Tallón *et al.*, 2012) quienes al utilizar cloro al 20% durante 15 ó 20 minutos para la desinfestación de varetas provenientes de invernadero o campo en diferentes especies de cítricos (naranja dulce, naranja agria, limón, lima y algunos patrones), lograban la obtención de varetas libres de contaminantes. Niedz y Bausher (2002) mencionan que el cloro comercial tiene dos compuestos que pueden hacer más eficiente el proceso de desinfestación. El cloro al 20% libera un compuesto llamado hipoclorito (OCl^-) y aun cuando el ácido hipocloroso (HOCl) es más efectivo, el hipoclorito tiene una acción germicida que ayuda a la reducción de contaminantes.

Estos 9 experimentos arrojaron como resultado la identificación de un protocolo para realizar la desinfestación de varetas de limón persa provenientes de campo para la utilización de estas como explante en el establecimiento *in vitro* (Figura 5). El protocolo final consistió en lavar las varetas (sin hojas ni espinas) con abundante agua y jabón líquido antibacterial (tallándolos con un cepillo de dientes de cerdas suaves), enjuagarlos bajo el chorro de agua hasta eliminar completamente los residuos de jabón, colocarlos durante 12 h. en una solución con Kasumin[®] (1 mL L^{-1}), PPM (1 mL L^{-1}) y Agry-Gent Plus[®] (0.5 g L^{-1}), transcurrido el tiempo retirarlos de la solución, todas aquellas varetas que flotaron o adquirieron color amarillo por efecto de la solución, fueron eliminadas. Con guantes de látex y tijeras de podar previamente desinfectadas (con etanol 96%), se disectaron las varetas en segmentos de aproximadamente 5 cm y fueron colocadas en frascos de vidrio con tapas de plástico, se les adicionó etanol al 70% y se mantuvieron en agitación (250 rpm) constante por

3 minutos; el alcohol fue eliminado y se colocaron en cloro al 20% durante 20 min (nuevamente se mantuvo en agitación constante (250 rpm)), finalmente el cloro fue eliminado y se trasladaron a la campana de flujo laminar, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se disectaron con pinzas y bisturí en explantes (nodales e internodales) de aproximadamente 1-2 cm y se establecieron *in vitro*.

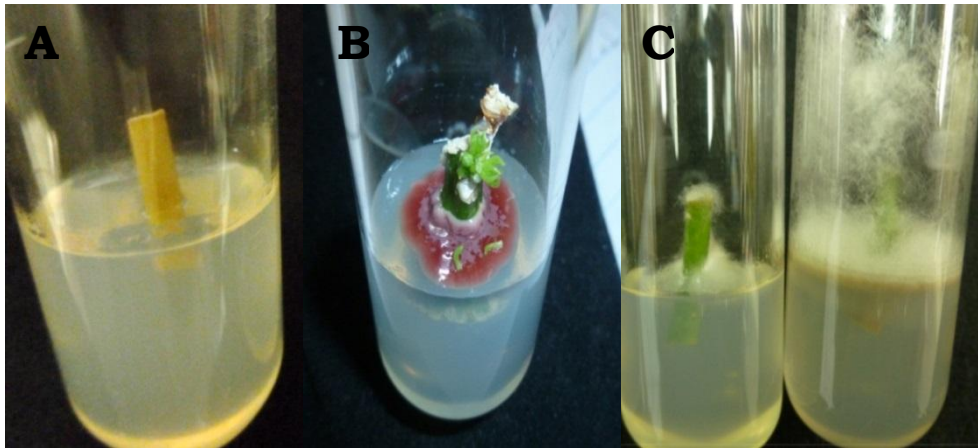


Figura 4. Explantes de limón persa provenientes de campo, muertos y/o contaminados después del tratamiento de desinfestación. A) Segmento internodal muerto a los 12 días después del establecimiento (DDE) cuyo tratamiento de desinfestación fue con Kasumin® 2 mL L⁻¹ durante 12 h., etanol 70% y cloro 40% por 15 minutos, establecidos en medio MS; C) Segmento nodal con brote axilar, contaminado con bacterias a los 14 DDE, desinfestado con Kasumin® 2 mL L⁻¹ durante 3 h., etanol 70% y cloro al 20% por 20 minutos, establecido en medio MS con 1 mL L⁻¹ de PPM; C) Entrenudos contaminados con hongos a los 7 DDE, previamente desinfestados con 0.5 g L⁻¹ de Ridomil® y 1 mL L⁻¹ de Kasumin® por 12 h., etanol 70% y cloro 10% por 20 minutos, establecidos en medio MS el cual contenía Ridomil® y Kasumin® en las mismas concentraciones mencionadas anteriormente.

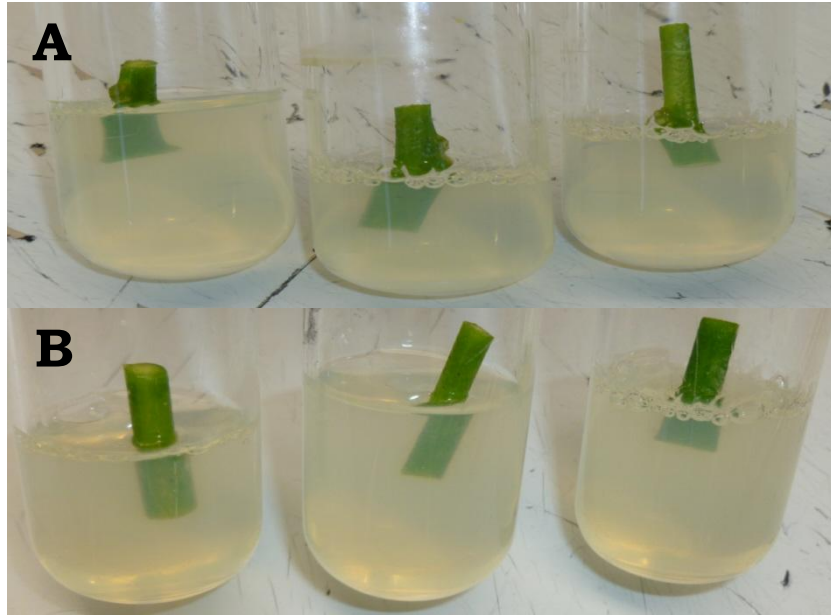


Figura 5. Supervivencia de explantes nodales (A) e internodales (B), provenientes de Veracruz en medio MS suplementado con 1 mL L^{-1} de PPM a los 30 DDE, cuyo método de desinfestación fue mediante Kasumin® 2 mL L^{-1} por 3 h., etanol 70% y cloro al 10% por 20 minutos.

4.1.2 Efecto de diferentes compuestos (fitohormonas, precursores de fitohormonas y activadores de división celular) en el medio de cultivo en la inducción de brotes adventicios.

4.1.2.1 Experimento 1. Uso de citocininas (BAP) para la inducción de brotes adventicios.

No se logró la brotación de ninguno de los segmentos internodales en el medio suplementado con BA con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 6A), lo cual contrasta con algunos resultados obtenidos en anteriores investigaciones en donde mencionan que el uso de BA, tiene un efecto positivo para la obtención de brotes adventicios, mediante organogénesis directa y/o indirecta, utilizando como explantes segmentos internodales o epicotilos en diferentes especies de cítricos. Su efecto lo atribuyen a que BAP mejora la eficiencia del proceso de organogénesis, estimulando la regeneración de brotes adventicios en concentraciones bajas ($0.5\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$) e inhibiéndolo a concentraciones más altas ($2\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$); sin embargo también se hace mención

a que los requerimientos de fitohormonas para inducir brotes y el número de brotes producidos por estas, dependen de cada especie (Kobayashi *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2008; Tavano *et al.*, 2009; Curti y Mirkov, 2011; Germaná *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2011). Por lo tanto, para limón persa, el uso de BAP no tuvo un efecto favorable en la inducción de brotes adventicios utilizando segmentos internodales, bajo las condiciones usadas en la presente investigación.

Por otro lado, la brotación en segmentos nodales bajo estos mismos tratamientos fue de 96%, pero no hubo un tratamiento realmente significativo en la formación de brotes axilares, el tamaño de los brotes no era mayor a 1 cm de longitud, por lo tanto, no había formación de entrenudos (Figura 6B). Duran-Vila (1989) menciona que el uso de BA a una concentración de 1 mg L⁻¹ en tres especies de cítricos favorecían la formación de brotes laterales (0.5-2 cm), mientras que dosis más altas inhibían la formación y crecimiento del brote, lo cual difiere de nuestros resultados, dado que en todas las concentraciones de BA (1, 2 y 4 mg L⁻¹) se logró la obtención de brotes laterales (0.5-1 cm).

4.1.2.2 Experimento 2. Uso de BAP combinado con AIA y ANA para la inducción de brotes adventicios.

En este experimento no se obtuvo brotación en segmentos internodales (Figura 7A), mientras que en segmentos nodales la brotación fue del 100%, se obtuvo un total de 384 brotes, con un promedio de cuatro brotes por explante. Estos resultados son similares a los obtenidos por Al-Bahrany (2002) y Marutani-Hert y colaboradores (2011), quienes encontraron que al utilizar BAP combinado con AIA o ANA en segmentos nodales de diferentes especies de cítricos (*C. aurantifolia*, *C. mitis*, *C. paradisi* y *C. sinensis*) promueven la brotación de 1-9 brotes por explante, proponiendo que la presencia de ANA

induce la formación de brotes, que el BAP aumenta el número de brotes por explante y que AIA coadyuva al desarrollo de estos. Además estos autores mencionan que estas fitohormonas a altas y bajas concentraciones inhiben la formación de brotes axilares, lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que el tratamiento con una mayor brotación en limón persa fue en el medio MS suplementado con 1 mg L^{-1} de BA, a concentraciones más altas o más bajas que estas, a pesar de que hubo brotación esta fue mucho menor que la obtenida con 1 mg L^{-1} de BA, la cual produjo un total de 63 brotes axilares a partir de 11 segmentos nodales, registrando un promedio de 5.7 brotes por explante. Los brotes obtenidos eran de color verde, turgentes y arrosetados (Figura 7B), difícil de separarlos del explante original ya que se disgregaban, el tamaño era de 0.5 a 1 cm, y presentaron problemas de defoliación (22%) (Figura 7C) formación de callo (23%) (Figura 7D) o ambas (28%), evitando con ello la elongación del brote y la formación de entrenudos. Marutani-Hert y colaboradores (2011) mencionan que los brotes que se obtenían a partir de segmentos nodales de *C. mitis*, *C. paradisi* y *C. sinensis*, también tenían problemas de defoliación. Lo anterior se puede explicar cómo una respuesta fisiológica por parte del explante ante la presencia de etileno dentro de los contenedores de cultivo *in vitro* (Leng et al., 2004; Heo et al., 2006; Tisserat and Vaughn, 2008; Duclercq *et al.*, 2011), producidos por las regiones nodales de los explantes, ya que además de las zonas meristemáticas, son las regiones más activas para la biosíntesis de etileno, fitohormona involucrada en la abscisión (Taiz y Zeiger, 2006).

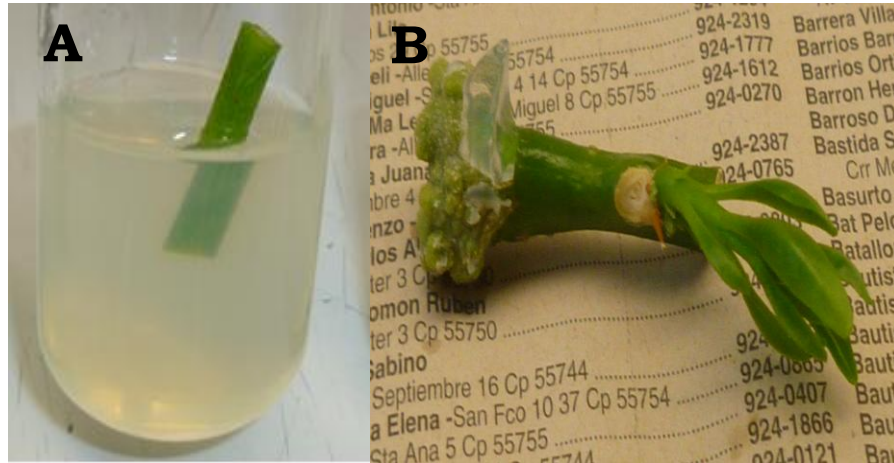


Figura 6. Segmento internodal (A) y nodal (B), en medio MS suplementado con BA (2 mg L^{-1}).

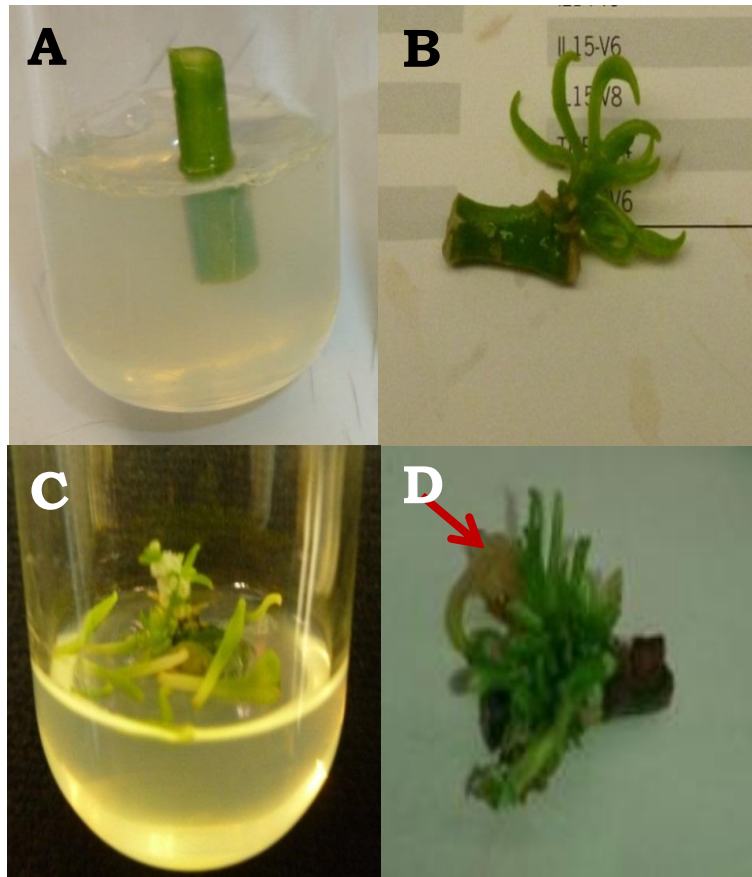


Figura 7. Explantes de limón persa establecidos en medio MS suplementado con BA, combinadas con ANA o AIA. A) Segmento internodal en medio BA 2 mg L^{-1} y AIA 0.5 mg L^{-1} ; B) Brote axilar en medio BA 1 mg L^{-1} ; C) Brote axilar en medio BA 2 mg L^{-1} y ANA 0.5 mg L^{-1} con problemas de senescencia foliar; D) Brote axilar en medio BA 4 mg L^{-1} y ANA 0.5 mg L^{-1} con formación de un callo de consistencia gelatinosa en la base del explante (flecha).

4.1.2.3 Experimento 3. Uso de nitrato de plata como control de defoliación in vitro y AG3 para elongación de brotes axilares

En los brotes axilares establecidos en AG₃ se logró la elongación de algunos explante de 0.5 a 1.5 cm (Figura 8); sin embargo la mayoría se mantenían con una altura promedio de 0.5 cm (Figura 9A), conservando la forma de roseta (Figura 9B) y nula formación de entrenudos (Figura 9C). Este tratamiento favoreció el desarrollo de hojas, pero en un lapso de aproximadamente 25 días ocurría senescencia y por lo tanto defoliación. En aquellos explantes menores a 0.1 cm se observó un desarrollo favorable del explante, alcanzando un tamaño de 2-3 cm y con un promedio de 3 brotes por explante (Figura 10), aunque también se observaron entrenudos cortos.

El efecto del ácido giberélico varía entre genotipos y especies, ya que las mismas concentraciones de esta hormona utilizada en diferentes genotipos puede o no causar respuestas diferentes (Pérez-Tornero *et al.*, 2010), independientemente de que éste estimule el crecimiento celular, termina con la dormancia de las yemas y activa la elongación de algunas especies de cítricos (Kotsias y Roussos, 2001). Maggon y Shing (1995), menciona que AG₃ inhibe la formación de brotes en *C. sinensis*, mientras que para *C. limon* y algunos portainjertos, el uso de AG₃ aumenta la brotación axilar y multiplicación de brotes a partir de segmentos nodales maduros (Kotsias y Roussos, 2001; Pérez-Tornero *et al.*, 2010; Tallón *et al.*, 2012). Sin embargo para el caso de limón persa, el efecto de AG₃ a una concentración de 1.5 mg L⁻¹, a pesar de lograr la elongación de unos pocos explantes, no produjo una respuesta favorable, ya que no se logró una elongación mayor y los explantes conservaban entrenudos cortos y pequeños.

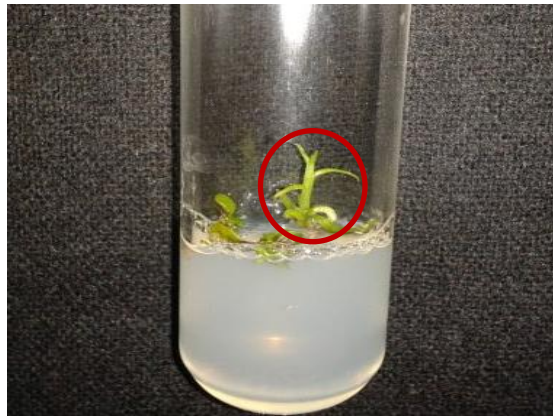


Figura 8. Brote axilar establecido en medio MS suplementado con 1.5 mg L⁻¹ de AG3, el cual logró una elongación de hasta 1.5 cm (círculo rojo).

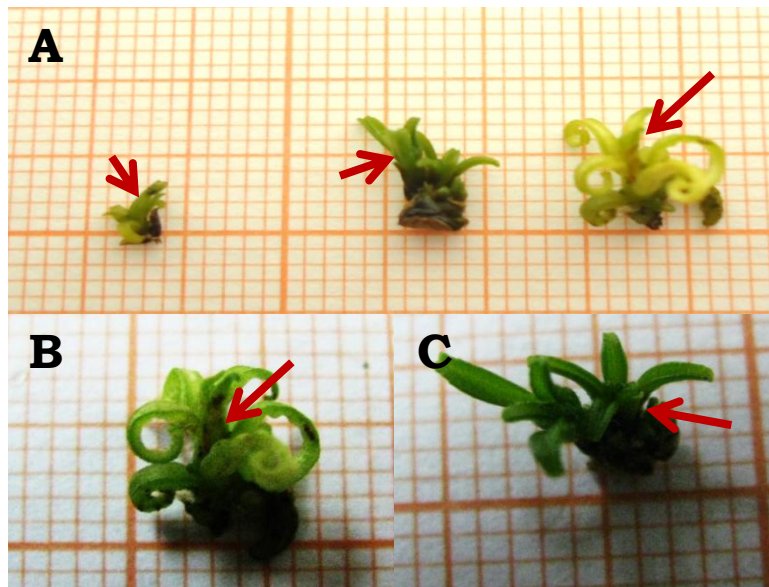


Figura 9. Brotes axilares establecidos en medio MS suplementado con 1.5 mg L⁻¹ de AG3, donde no hubo formación de entrenudos (flechas). A) Brotes axilares cuya longitud promedio fue de 0.5 cm; B y C) Brotes axilares cuya apariencia era arrosetada y sin entrenudos.



Figura 10. Elongación de brotes axilares en medio MS con 1.5 mg L⁻¹ de AG3, provenientes de un segmento nodal donde la elongación original de brotes fue de 0.1 cm.

En los explantes expuestos a AgNO₃, se logró una respuesta del 100% al tratamiento. Los 21 explantes respondieron de forma favorable, logrando detener la senescencia foliar *in vitro*, evitando con ello la defoliación de los explantes (Figura 11), ya que el AgNO₃ es un compuesto que inhibe la acción de etileno presente en el contenedor del medio de cultivo, el cual ocasiona la defoliación de los brotes obtenidos *in vitro*. El efecto que tiene el AgNO₃ en el medio de cultivo, es el de evitar la acción del etileno, biosintetizado en las yemas del explante. Se sabe que los iones de Ag⁺, en forma de AgNO₃ (nitrato de plata) ó Ag(S₂O₃)₂ (tiosulfato de plata), son potentes inhibidores de la acción de etileno, debido a su especificidad por competir por los sitios de unión ubicados en la membrana intracelular, que normalmente son ocupados por el cofactor Cu⁺⁺ (indispensable para la acción del etileno), logrando desplazarlo y evitando con ello la caída de las hojas en explantes *in vitro* (Taiz and Zeiger, 2006; Naik y Chand, 2003). No obstante, estos explantes no se pudieron utilizar como fuente de entrenudos, debido a que la distancia entre las yemas axilares era muy pequeña.



Figura 11. Brote axilar sin senescencia foliar por efecto del nitrato de plata y con formación de entrenudos cortos (flechas).

4.1.2.4 Experimento 4. Uso de precursores de reguladores del tipo de las citocininas (adenina y sulfato de adenina) para la inducción de brotes adventicios.

A los 30 días de estar en contacto con el medio suplementado con adenina y sulfato de adenina (80 mg L^{-1}), se logró obtener cuatro brotes adventicios (Figura 12), lo que representa el 7% del total de los explantes; tres de ellos se desarrollaron en medio MS suplementado con 80 mg L^{-1} de sulfato de adenina (Figura 12 A-C), mientras que el otro se obtuvo del medio MS suplementado con 80 mg L^{-1} de adenina (Figura 12D). Sin embargo, 60 días después de que se indujo la formación de los brotes adventicios, solo uno de los explantes inducidos en sulfato de adenina se elongó 2 cm y desarrolló de 6-7 hojas sin presentar defoliación (Figura 13). Lo anterior contrasta con los resultados de Ramesh y colaboradores (2005) quienes reportan que para *Bacopa monnieri* el uso de sulfato de adenina a una concentración de 80 a 100 mg L^{-1} no tuvo un efecto benéfico para la formación de brotes. El uso de precursores de citocininas como la adenina y sulfato de adenina solo o en combinación con otras fitohormonas, se han utilizado en diferentes especies, con un rango de concentraciones de 25 a 120 mg L^{-1} aumentando el número

de brotes por explante (segmentos nodales), ya que estos compuestos promueven la división y diferenciación celular y tienen efecto sinérgico con BAP (citocinina) (Ramesh *et al.*, 2005; Nandagopal y Ranjita, 2006; Shrivastava y Banerjee, 2008; Bantawa *et al.*, 2009; Tallón *et al.*, 2012). Para el caso de cítricos este tipo de compuestos se ha utilizado muy poco, la adenina a bajas concentraciones (4 mg L^{-1}) en diferentes portainjertos de cítricos, demostró que tiene buenos resultados en la producción de brotes axilares cuando actúa con BAP (2 mg L^{-1}) (Tallón *et al.*, 2012). En este trabajo se logró la obtención de brotes adventicios a partir de segmentos internodales de limón persa en presencia de ambos compuestos y en concentraciones 20 veces más alta (80 mg L^{-1}) que las reportadas por Tallón y colaboradores (2012).

Estos resultados se pueden explicar por diferentes fenómenos, uno de ellos es la orientación del explante (polaridad), García-Luis y colaboradores (2006) mencionan que la vía de regeneración de brotes en *Toyra citrange* depende de la polaridad del explante y el contacto con el medio de cultivo. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, ya que cuando se colocó el explante con la parte basal en el medio, no hubo respuesta por parte del explante, mientras que cuando se colocó con la parte apical en contacto con el medio de cultivo, en la parte basal del explante (o distal con respecto al medio), se formó un callo del cual se regeneraron de brotes adventicios. Lo anterior se puede explicar debido a que la cantidad de núcleos en fase S (duplicación del ADN) identificado en los extremos basales es mucho mayor que en los extremos apicales (Peña *et al.*, 2004), lo que indica que las células de los extremos basales entran más rápido al ciclo celular, por lo que el crecimiento y división de estas células empezarán antes que las que se encuentran en el extremo apical. Por lo anterior, se puede decir, que la respuesta morfogénica de una especie, puede estar influenciado por la orientación del explante, el tipo de hormona (o precursor de fitohormonas) y la concentración utilizada y genotipo de la especie, tal y como lo mencionan distintos autores (García-Luis *et al.*,

1999; Bordon *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2004; García-Luis *et al.*, 2006; Marques, *et al.*, 2011).

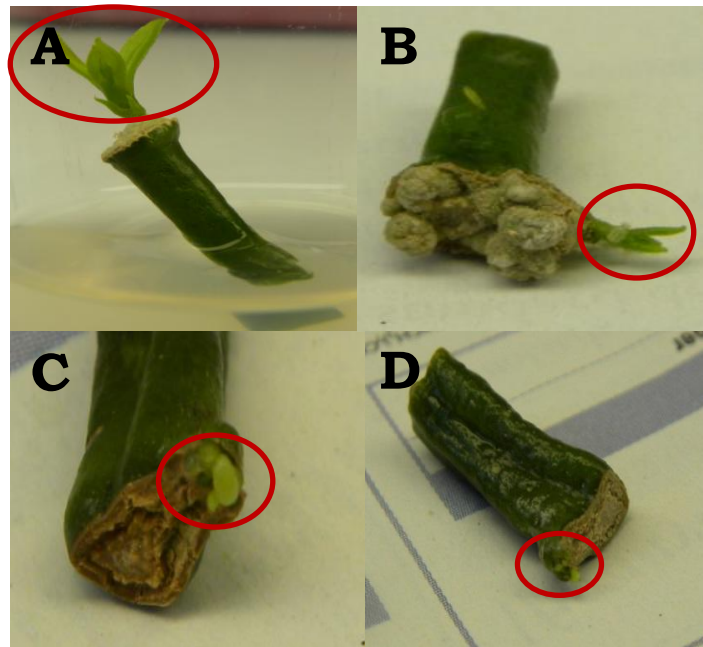


Figura 12. Brotes adventicios (círculos rojos) provenientes de segmentos internodales de limón persa establecidos en medio MS suplementado con sulfato de adenina (A-C) y adenina (D) a 80 mg L^{-1} .

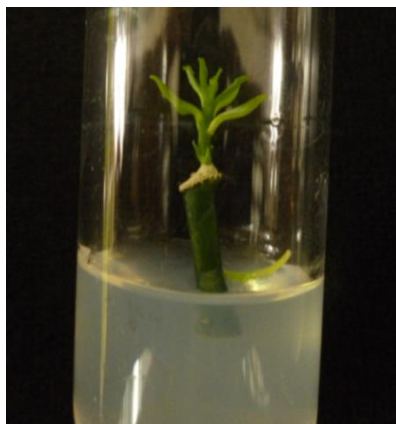


Figura 13. Brote adventicios proveniente de un segmento internodal a los 60 días de establecimiento en medio MS suplementado con 80 mg L^{-1} de sulfato de adenina.

4.1.2.5 Experimento 5. Uso de precursores de reguladores (adenina, sulfato de adenina y 4-FAA) y activadores de división celular (triacontanol) para la inducción de brotes adventicios.

En los tratamientos de A, SA y TRIA se observó formación de callo desde los 10 DDE (experimento 1 y 5) o 20 DDE (experimento 4) en un 70-80% de los explantes; el callo al cual dieron origen era de color verde, pequeños, no ocupaba toda la superficie del explante, era turgente y aparentemente compacto (Figura 14). A pesar de los cambios evidentes (formación de callo) en los explantes sometidos a cada uno de los tratamientos, cabe mencionar que ninguno indujo cambios suficientes para dar origen a la formación de brotes adventicios observables a simple vista.

El uso de estos compuestos como reguladores de crecimiento o activadores de división celular, no es tan común; sin embargo, a partir de los años 90's en varios trabajos se ha utilizado con la finalidad de inducir morfogénesis. Como se ha mencionado el uso de sulfato de adenina y la adenina ha tenido la finalidad de inducir brotación. En especies como *Picrorhiza scrophulariiflora*, *Jatropha curcas*, *Holorrhena antidysenterica*, *Cichorium intybus*, *Bacopa monnieri* y en algunos cítricos como *C. macrophylla*, *C. aurantium* y *C. reshni*, aumentaron el número de brotes por explante (Raha y Roy, 2001; Ramesh *et al.*, 2005; Nandagopal y Ranjita, 2006; Shrivastava y Banerjee, 2008; Bantawa *et al.*, 2009; Tallón *et al.*, 2012). En la presente investigación se decidió aumentar la concentración de SA a 100 mg L⁻¹ ya que Bantawa y colaboradores (2009) reportaron excelente resultados bajo esta concentración con explantes nodales en una especie herbácea (*Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell.), sin embargo en limón persa utilizando segmentos internodales, lo que se logró fue la inducción de callo (Figura 14 A y C) en el 70-80% de los explantes. Lo anterior indica que concentraciones mayores a 80 mg L⁻¹ no favorecen la formación de brotes adventicios en esta especie. Resultados parecidos fueron obtenidos por Ramesh y colaboradores (2005) en

Bacopa monnieri quienes mencionan que una concentración de 100 mg L⁻¹ no mostró efecto benéfico para la especie, por lo cual, para limón persa se recomienda probar concentraciones menores a 80 mg L⁻¹ solas o combinadas con algunos otros reguladores de crecimiento como BAP (1-5 mg L⁻¹), ya que se reporta que estos compuestos pueden actuar en sinergia con otras citocininas, estimulando crecimiento celular y mejorando con ello la formación de brotes (Shrivastava y Banerjee, 2008; Tallón *et al.*, 2012).

Por otra parte el uso de TRIA reportado como un potente regulador de crecimiento (Malabadi *et al.*, 2005b; Verma *et al.*, 2011), tiene un efecto favorable en la morfogénesis en diferentes especies (*Dendrobium nobile*, *Salvia officinalis*, *Bixa Orellana*, *Malus domestica*, *Cerasus fruticosa*, *Arachis hypogaea*, *Melissa officinalis* y *Costus speciosus*) a concentraciones de 1-5 mg L⁻¹ solo o combinado con algunos reguladores de crecimiento (BAP, ANA, AIA). La mejor respuesta para varias especies se ha obtenido con el uso de pequeñas concentraciones (<1 mg L⁻¹), provocando diferentes respuestas incluyendo, inducción de brotes, aumento en la tasa de multiplicación, incremento de peso fresco, aumento en el número de raíces, incremento del contenido de clorofila, producción de metabolitos secundarios (Tantos *et al.*, 1999; Tantos *et al.*, 2001; Malabadi *et al.*, 2005a y 2005b; Grzegorzcyk *et al.*, 2006; Parimalan *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2011). Las pequeñas concentraciones de triacontanol son biológicamente efectivas ante la sensibilidad de algunos compuestos de los explantes (Malabadi *et al.*, 2005a), provocando que el triacontanol, metabolitos de triacontanol o algunos mensajeros secundarios, se transporten de manera rápida después de la aplicación inicial y se integren en el metabolismo de carbohidratos en las plantas (auxiliados por enzimas) y en algunos procesos como el de crecimiento (Ries *et al.*, 1977; Ries *et al.*, 1988). El efecto de triacontanol en el aumento de tamaño, no es causado únicamente por la absorción de agua y el alargamiento celular sino por el incremento en el número de células que provoca (Hangarter and Ries, 1978).

La utilización de triacontanol en cultivo *in vitro* de cítricos, así como el uso de segmentos internodales como explantes, no está documentado, por lo que este sería el primer trabajo donde se reporta su efecto. La concentración utilizada se basó en el trabajo de Parimalan y colaboradores (2009), donde para *Bixa orellana* (arbusto) 4.91 mg de triacontanol en combinación con 1.99 mg de BA y 0.00876 de AIA, y obtuvieron 213 brotes a partir de 18 segmentos nodales. Ellos mencionan que la interacción de triacontanol con BAP y AIA tiene un gran efecto en la multiplicación de brotes axilares. No obstante, en base a los resultados obtenidos, se puede mencionar que el triacontanol en segmentos internodales de limón persa no indujo la formación de brotes adventicios, pero si el desarrollo de callo verde (Figura 14B), aparentemente compacto y proveniente de la zona del cambium. Esto coincide en cierta manera con lo obtenido por Tantos y colaboradores (2001), quienes en un estudio del efecto de triacontanol en especies leñosas encontraron que el triacontanol mostró un buen efecto en manzano, incrementando el número de brotes a una concentración de 4.39 mg pero en cereza no influyó en la multiplicación de brotes; sin embargo, el uso de este compuesto puede ser efectivo en la micropropagación de algunas plantas leñosas.

Finalmente 4-FAA el cual es un compuesto que en muy pocas ocasiones se ha utilizado en cultivo de tejidos, pero cuando se incluye como parte de un protocolo de regeneración, tiene buenos resultados. Las especies en las cuales se ha utilizado son en su mayoría herbáceas, prácticamente en ninguna especie leñosa.

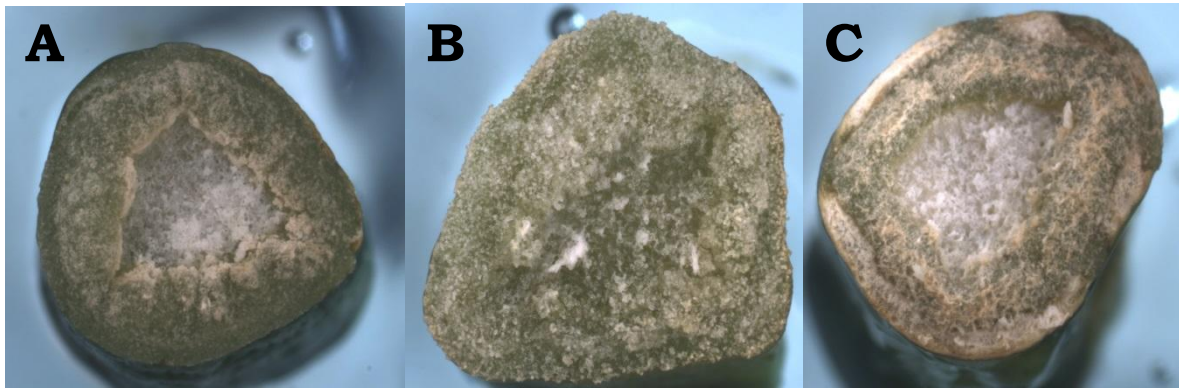


Figura 14. Formación de callos en segmentos internodales a los 20 DDE en medio MS suplementado con: A) 80 mg L⁻¹ de adenina; B) 4.91 mg de triacontanol combinado con BA (1.99 mg) y AIA (0.00876) y C) 80 mg L⁻¹ de sulfato de adenina.

Con el uso de 4-FAA en el medio de cultivo (experimentos 1, 4 y 5) se observó la formación de callo en 90-100% de los explantes, desde los 10 DDE y sobre toda la superficie del explante. Este callo era de color verde o blanco, turgente y aparentemente compacto, el cual se fue desarrollando y aumentando de tamaño con el tiempo (Figura 15); este callo comparado con los demás tratamientos, fue el de mayor tamaño; sin embargo al igual que en triacontanol, adenina y sulfato de adenina, tampoco se indujo la formación de brotes adventicios. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mukeshimana y colaboradores (2012) donde el uso de 4-FAA (0.89 y 1.82 mg) en el medio de cultivo no observó ningún indicio de regeneración en diferentes cultivares de frijol.

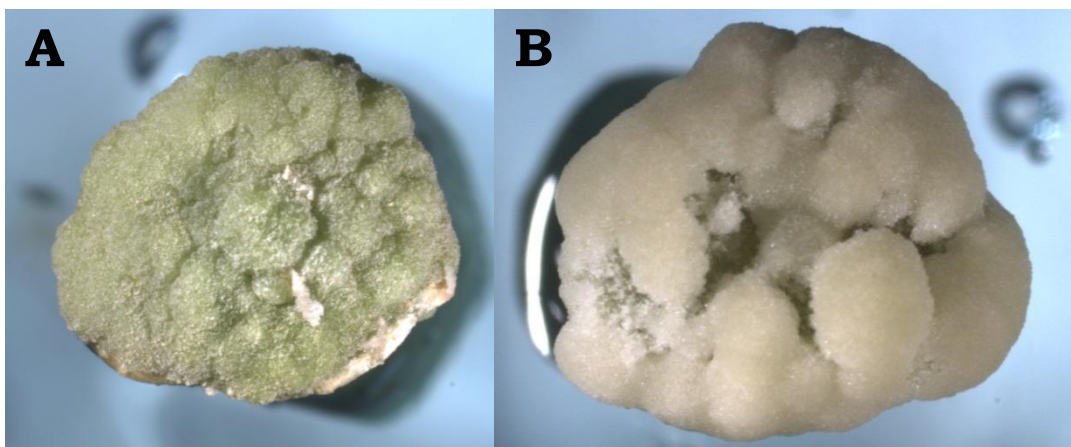


Figura 15. Formación de callo en segmentos internodales establecidos en medio MS suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de 4-FAA. A) Callo de color verde a los 20 DDE; B) callo de color blanco a los 20 DDE.

La regeneración de brotes posterior a la formación de callo por efecto de 4-FAA está reportada en diferentes especies [*Allium cepa* L. (cebolla), *Phragmites communis* Trin (carrizo), *Pharbitis nil* (campañilla japonesa) e *Ipomea batatas* (camote)]. En cebolla se reporta la formación de callo con 8.5 mg de 4-FAA combinada con 2iP y caseína hidrolizada en un cultivo en suspensión, dando un alto porcentaje de regeneración de plántulas. 4-FAA actúa como una auxina, provocando un efecto benéfico para el cultivo de tejidos en 22 cultivares de esta especie (Tanikawa *et al.*, 1996; Tanikawa *et al.*, 1998; Kamata *et al.*, 2011). En carrizo se hizo una comparación con dos compuestos de tipo auxínico (2,4-D y 4-FAA) y encontraron que ambos promovían la formación de callo con la concentración de 1 mg L⁻¹ en segmentos nodales de esta especie. Las diferencias se encontraron a nivel de la calidad de callo generada por cada compuesto, ya que los desarrollados en 2,4-D eran friables, mientras que los obtenidos con 4-FAA eran duros y compactos, con baja capacidad de regeneración por parte de este compuesto, aun cuando la eficiencia en la inducción de callo (93%) fue mayor con 4-FAA que con 2,4-D. Sin embargo, al pasar estos explantes a un medio MS suplementados con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D se recuperaba la friabilidad del callo, convirtiéndose en un callo embriogénico (Lee *et al.*, 2012). Por otra en la campanilla japonesa (*Pharbitis nil* Choisy), el uso de 4-FAA en el medio de cultivo, dio origen a la formación de callos embriogénicos, el mayor porcentaje se observó cuando se utilizó 1 mg L-

¹, con una respuesta del 66.5% (Otani y Shimada, 1998). Así mismo, Otani y colaboradores (1998), reportan formación de callos organogénicos en camote (*Ipomea batata*), en la misma concentración de 4-FAA (1 mg L⁻¹). Luo y colaboradores (2006), describieron un método eficiente para la propagación y transformación de esta especie, logrando la inducción de callo en hojas y peciolo, cultivados en dos medios de cultivo, con una duración de 5-6 días en cada medio; el primero además de otros compuestos contenía 0.2 mg L⁻¹ de 4-FAA, mientras que el segundo contenía 0.2 mg L⁻¹ de zeatina.

4.2 Estudio histológico del efecto de precursores de fitohormonas y activadores de división celular en explantes establecidos *in vitro*.

4.2.1 Epidermis.

La epidermis de tallo de limón persa, es un tejido formado por una sola capa de células pequeñas, isodiamétricas en cortes transversales y rectangulares en cortes longitudinales, forma un estrato continuo sin espacios intercelulares cubierto por una cutícula. Se presentaron algunos cambios en este tejido: en el tratamiento de 4-FAA a los 30 días, la epidermis perdió su integridad a consecuencia del crecimiento del callo y el crecimiento de células parenquimáticas provenientes de la corteza.

4.2.2 Corteza.

La corteza es un tejido compuesto por células parenquimáticas con espacios intercelulares principalmente en la parte media. El tamaño de las células aumenta hacia la parte media, siendo células pequeñas e isodiamétricas debajo de la epidermis. La corteza contiene glándulas oleaginosas dispersas y de diferentes tamaños. Se identificaron cristales prismáticos subepidermicos. En el testigo se identificaron hasta 23 filas de células en este tejido.

Al evaluar este tejido en los diversos tratamientos, se encontraron diferencias sobre todo en la parte cercana al floema identificándose células pequeñas rectangulares y en ocasiones amorfas a consecuencia del efecto de los tratamientos. Cabe destacar que en el medio suplementado con 4-FAA se observó que este tipo de células eran más pequeñas que en el resto de los tratamientos sobre todo las cercanas a floema, las cuales dieron origen a divisiones periclinales. Esto es posible debido a que las células de la corteza son células parenquimáticas, las cuales tienen la función de dividirse y dar origen a brotes adventicios (Esau, 1982).

Al evaluar el efecto de adenina, sulfato de adenina, TRIA y 4-FAA en el ancho relativo de corteza externa, se encontró que el rango de valores osciló entre 16.5 y 28 (Figura 16), con un promedio de 21.38 y 20.98 (desviación estándar (D.E.) de 10.83 y 10.45) para los materiales provenientes de Nayarit y Veracruz, respectivamente. En todos los tratamientos se observaron diferencias en el tamaño del tejido (Figura 17), con una tendencia a disminuir a los 10 DDE (17.7) con respecto al testigo, incrementándose a los 20 DDE (25.6) y disminuyendo nuevamente al alcanzar los 30 días (20.76) de evaluación, esto para los materiales provenientes de ambos estados (Nayarit y Veracruz). Lo anterior se pudo explicar porque a los 10 DDE posiblemente el tejido se deshidrató y disminuyó su tamaño, el cual se logró recuperar a los 20 DDE (aumento en el tamaño de las células), mientras que a los 30 DDE por efecto de los tratamientos se presentó división celular en esta área, disminuyendo nuevamente el tamaño de las células; sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Otra variable evaluada fue el diámetro relativo de células corteza, en el cual si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 18) donde los valores variaron entre 1 a 2.9, con un promedio de 1.8 y 1.7 (D.E. 1.01 y 0.95) en los experimentos de Nayarit y Veracruz, respectivamente. El

hecho de observarse valores menores a los del testigo, es debido a que los tratamientos indujeron el proceso de división que dio como resultado células más pequeñas. Cabe destacar que todos los tratamientos provocaron este efecto tanto en explantes provenientes de Veracruz como de Nayarit; sin embargo, los explantes de Nayarit cultivados en 4-FAA y sulfato de adenina (Figura 19) mostraron el menor tamaño de células (1.23 y 145 respectivamente), siendo más notorio en el tratamiento de 4-FAA (1.23).

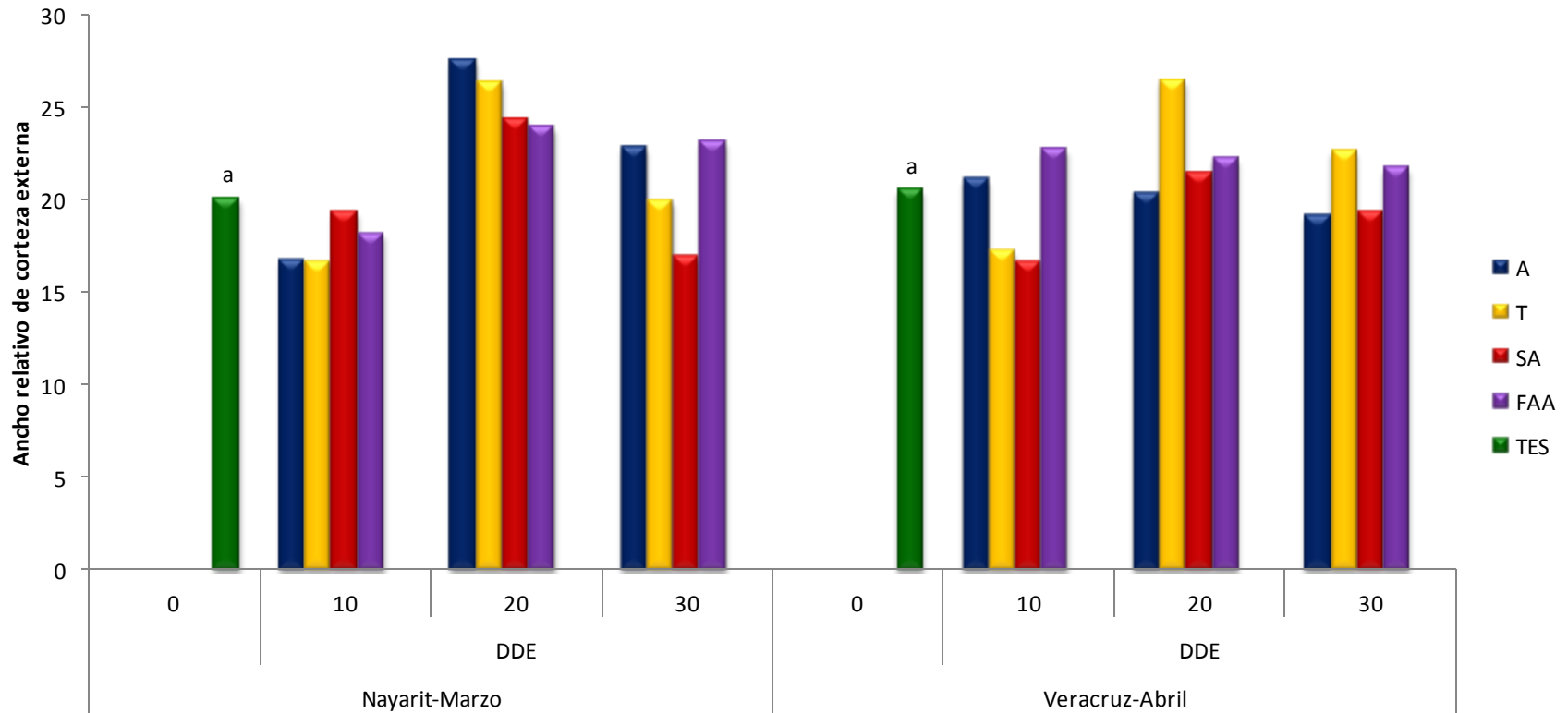


Figura 16. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el ancho relativo de corteza externa (AC) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

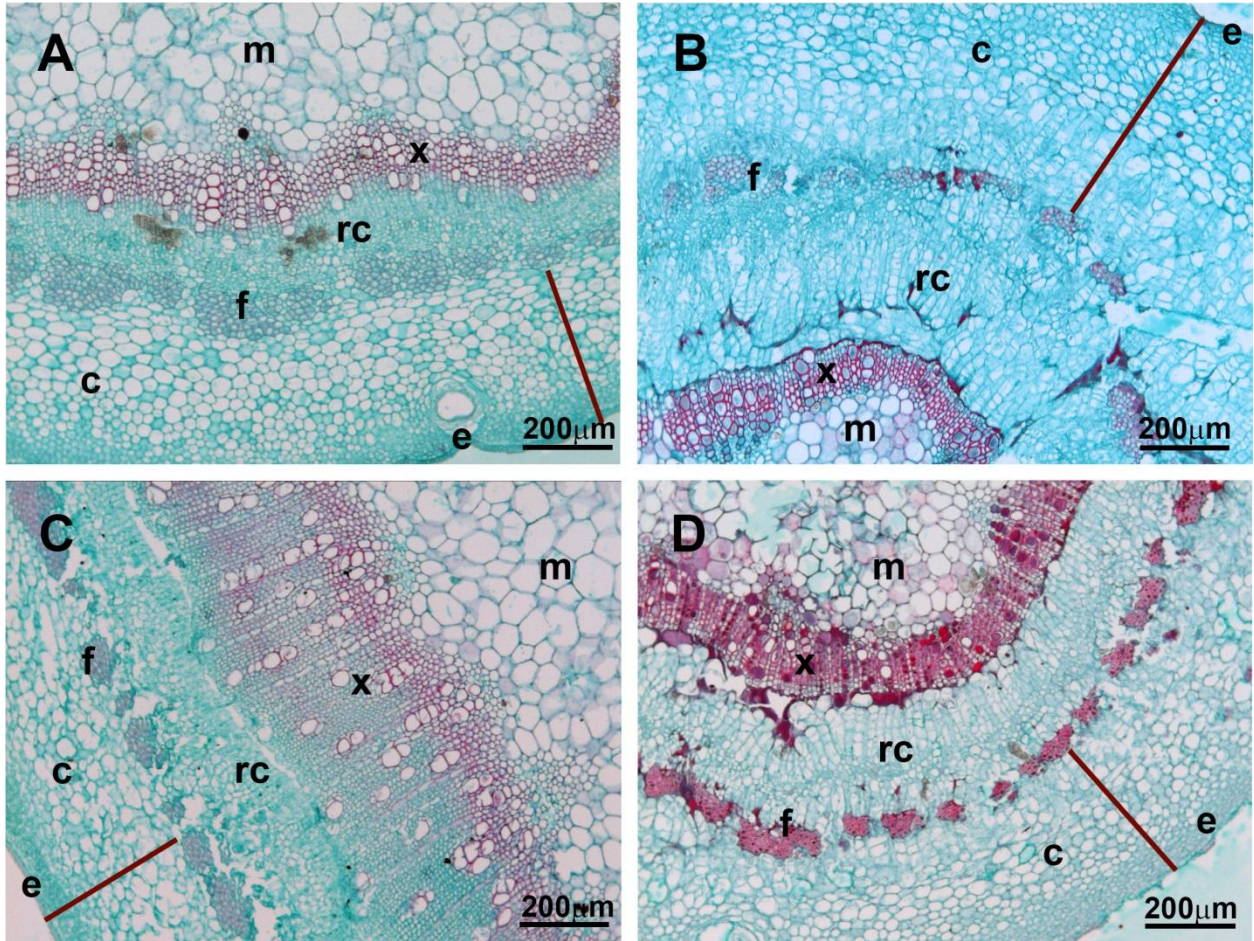


Figura 17. Cortes transversales de limón persa para la evaluación del ancho de corteza externa (línea roja) de explantes provenientes de Nayarit A) testigo y B) 4-FAA a los 30 DDE; y Veracruz C) testigo y D) sulfato de adenina a los 20 DDE). Corteza, xilema y médula no mostraron cambios significativos. e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

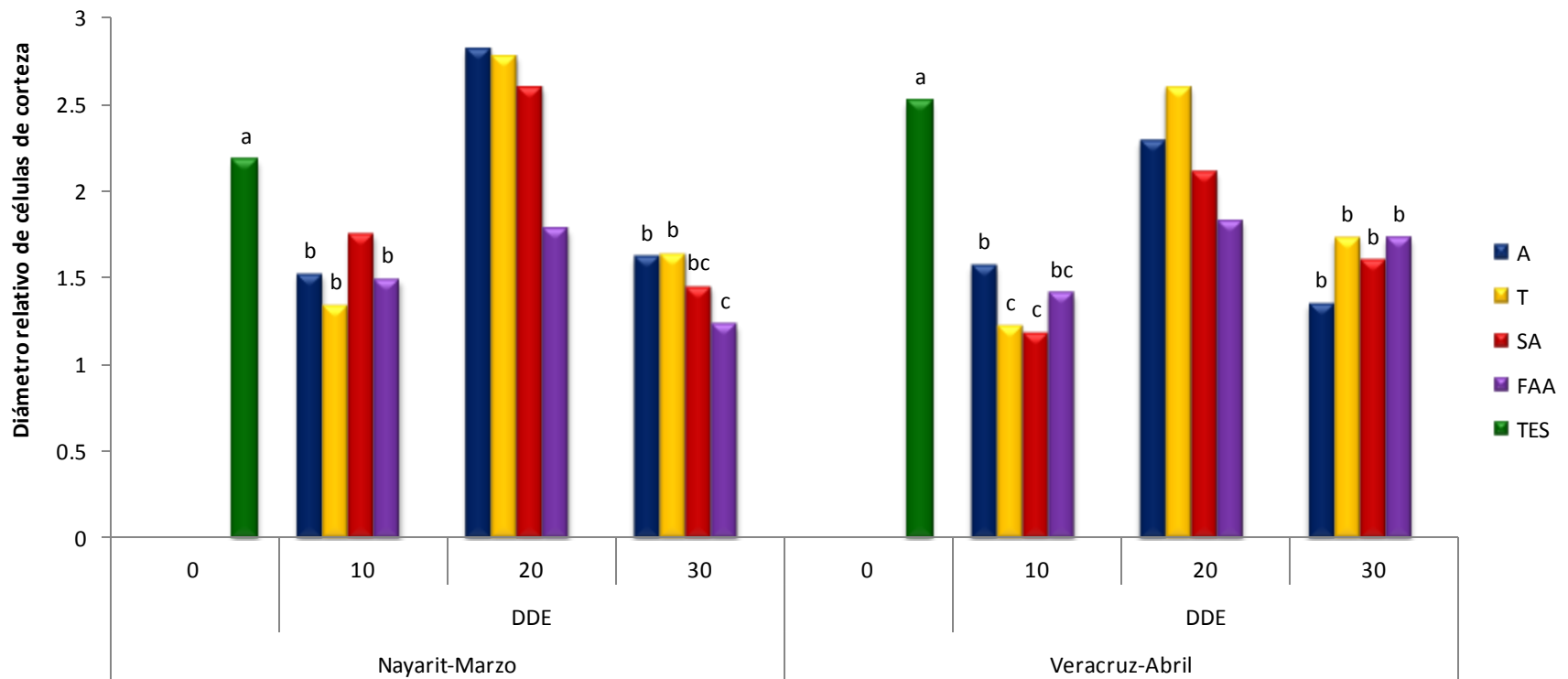


Figura 18. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el diámetro relativo de células de corteza (DCC) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

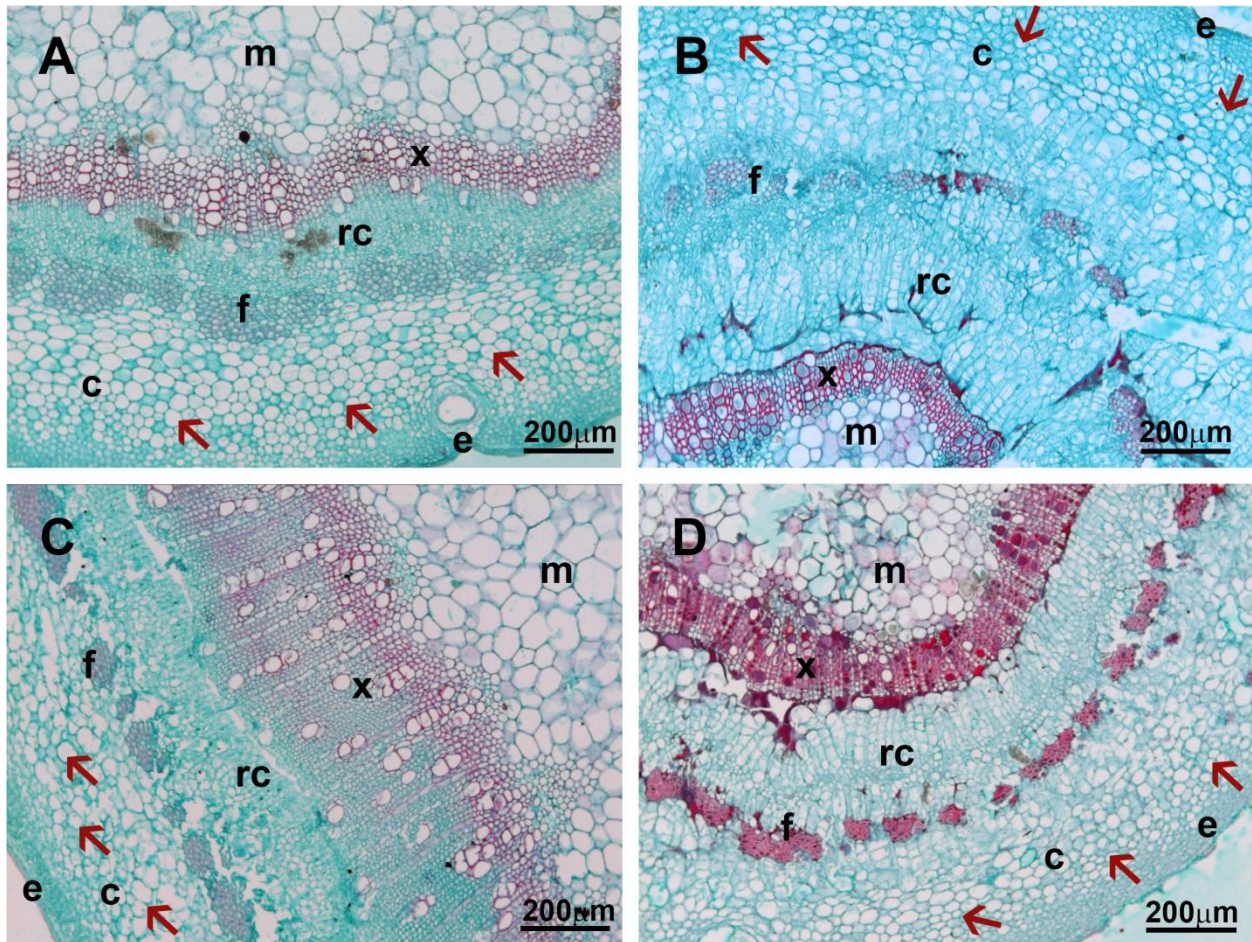


Figura 19. Cortes transversales de limón persa para la evaluación de diámetro de células de corteza ubicadas en la parte media (flechas) en explantes provenientes de Nayarit A) testigo y B) 4-FAA a los 30DDE; y Veracruz C) testigo y D) sulfato de adenina a los 20 DDE. Corteza, xilema y médula no mostraron cambios significativos. e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

En cortes longitudinales también se evaluó la variable ancho relativo de corteza, en donde se observó que las células eran rectangulares, alargadas y grandes, con algunos espacios intercelulares sobre todo en la zona media, este tipo de cortes permitió identificar que para el tratamiento con 4-FAA hubo división celular la cual contribuyó en la formación de callo. Los valores relativos obtenidos en esta variable fluctuaron entre 17.9 y 30.3, con un promedio de 24.46 y 22.59 (D.E. de 12.42 y 11.82) para los experimentos de Nayarit y Veracruz, respectivamente.

En los explantes provenientes de Nayarit, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 20) para esta variable en ninguna de las tres fechas evaluadas; mientras que en los explantes provenientes de Veracruz se identificaron diferencias a los 10 DDE en el tratamiento con sulfato de adenina, notándose una ligera disminución en el tamaño del tejido (17.93) (Figura 21). Con base en los resultados obtenidos, es posible inferir que los cambios anatómicos aun cuando estadísticamente no son diferentes, son suficientes para contribuir a la formación de callo, como sucedió al usar 4-FAA en ambos experimentos (Nayarit y Veracruz). Las diferentes respuestas obtenidas en las varetas provenientes de Nayarit y Veracruz posiblemente estén en función de su origen pues difieren en el manejo y condiciones ambientales (temperatura, humedad, precipitación), modificando con ello las condiciones de crecimiento de la planta madre, lo cual puede alterar o modificar la respuesta de los explantes a las condiciones de cultivo (Mrogisnski y Roca, 1991).

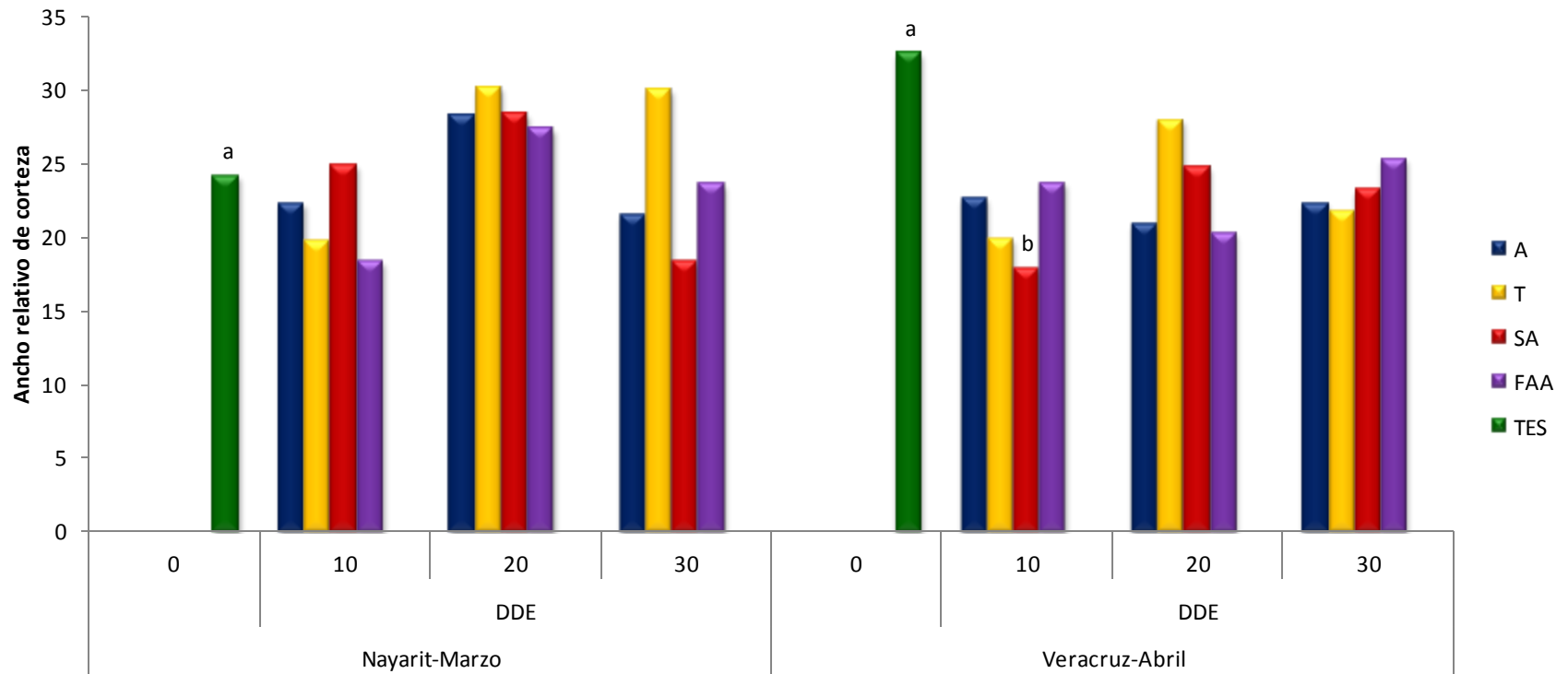


Figura 20. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el ancho relativo de corteza (AC) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorfenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

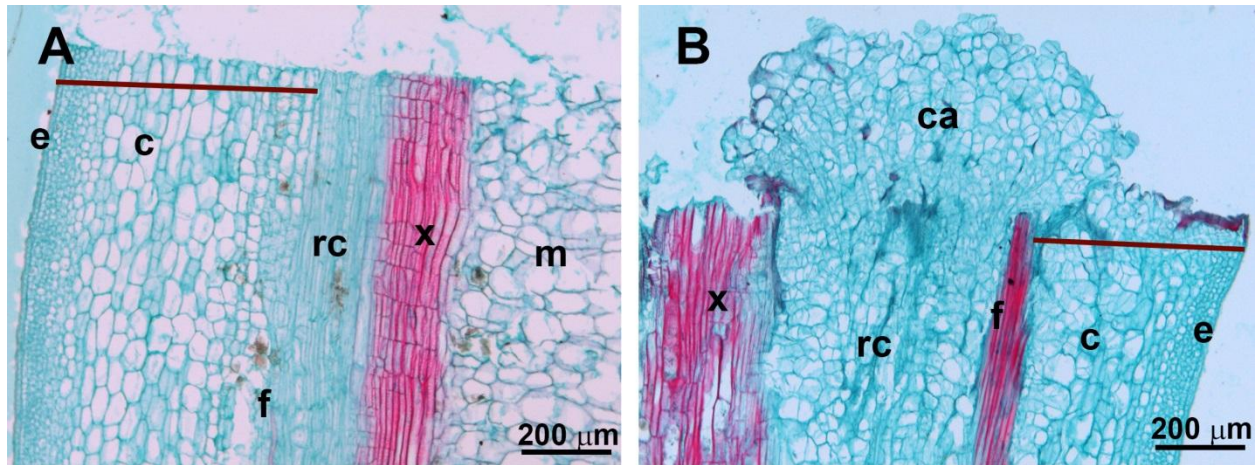


Figura 21. Cortes longitudinales de limón persa para evaluar el ancho de corteza (línea roja) de explantes provenientes de Veracruz (A) testigo y B) sulfato de adenina a los 10 DDE. e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema, m-médula y ca-callo.

4.2.3 Floema y Cambium.

El cambium es el meristemo lateral secundario responsable de la producción de floema y xilema secundario. En el explante testigo el cambium presenta una anatomía típica, formado de células iniciales largas fusiformes y células cortas, sin espacios intercelulares, paredes celulares delgadas y núcleo prominente. Los tratamientos promovieron en mayor o menor medida, dependiendo del tratamiento, la formación de tejido meristemático en dirección al floema. Este crecimiento contribuyó a la formación de callo en la región distal del explante (Figura 21B).

Hubo un incremento en el número de células, identificándose divisiones periclinales desde los 20 días en todos los tratamientos, a los 10 días el número de estratos en la región de dilatación varió de 4 a 7 capas de células, a los 20 días en el tratamiento con sulfato de adenina en materiales de “Veracruz” se dio un incremento en 24 capas de células; mientras que en los de Nayarit el mayor incremento fue en 4-FAA a los 30 días (18 capas de células) originando con ello un incremento en la región de ancho relativo de

floema (Figura 22). Estos resultados coinciden con los de Almeida y colaboradores (2003), quienes al utilizar segmentos internodales de *Citrus sinensis* identificaron un aumento en el diámetro del explante por efecto de la división celular del cambium desde los 15 días después del establecimiento.

En el testigo la región del floema está formado por elementos de tubo criboso, células de parénquima y paquetes de fibras en la posición del floema primario. En los tratamientos evaluados no se observaron diferencias en cuanto a las fibras y elementos de tubo criboso del floema con respecto al testigo, aunque cabe mencionar que en 4-FAA y sulfato de adenina se observó formación de cristales. Los cambios más relevantes estructuralmente hablando se observaron en las células de parénquima de este tejido, identificándose entre ellos divisiones periclinales desde los 20 días en todos los tratamientos evaluados, aumentando conforme transcurrían los días. Los tratamientos con 4-FAA (Nayarit) y sulfato de adenina (Veracruz) fueron los que mostraron mayor división celular, ya que las células nuevas llegaron hasta por encima de las fibras de floema a los 30 días (Figura 23B).

El ancho relativo de floema registrado en ambos experimentos abarcó un rango de 8.5 a 25, con un promedio de 13.9 para Nayarit (D.E. 7.14) y 13.85 para Veracruz (D.E. 7.58). Se lograron identificar diferencias significativas entre tratamientos (Figura 22), observándose en el experimento de Nayarit un incremento del tamaño de este tejido en prácticamente todos los tratamientos conforme iban transcurriendo los días, siendo 4-FAA a los 30 DDE el valor más alto (18.11) (Figura 23B). Por otro lado, en los materiales de Veracruz, también se observó un aumento de tamaño con respecto al tiempo; sin embargo, fue a los 20 DDE donde se alcanzó el máximo de 24.98 en el tratamiento de sulfato de adenina (Figuras 22 y 27D), siendo esta la mayor anchura registrada para ambos experimentos. Cabe resaltar que el promedio en las mediciones de esta variable fue prácticamente el mismo para Nayarit y Veracruz, descartando con

ello que las diferencias se deban al origen del explante. Lo anterior confirma que los cambios morfológicos fueron influenciados directamente por los componentes del medio de cultivo especialmente 4-FAA y sulfato de adenina. Peña y colaboradores (2004) mencionan que hay un efecto en el explante a consecuencia del uso de auxinas en el medio de cultivo, el cual favorece una rápida desdiferenciación en Carrizo citrange; sus resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en limón persa debido a que 4-FAA (compuesto auxínico) indujo una rápida desdiferenciación, provocando un crecimiento excesivo en el parénquima del floema. El sulfato de adenina (precursor de fitohormonas del tipo de las citocininas) también provocó esa respuesta en el explante, lo cual coincide con lo observado por Almeida y colaboradores (2003) los cuales al utilizar una citocinina (BAP) en el medio de cultivo, lograron inducir desdiferenciación en el explante. Lo anterior sugiere que los componentes del medio de cultivo son un factor determinante para la inducción de cambios morfológicos en este tejido.

En cortes longitudinales se realizó la evaluación de la variable índice de dilatación del cambium y floema, encontrando que los tratamientos provocaron un aumento de tamaño en la zona ubicada entre xilema y fibras de floema debido a la activa división en parénquima de floema y células del cambium, en las que se identificaron tanto divisiones periclinales como anticlinales, que dieron origen a la formación de un callo por encima de la superficie del corte. Los valores obtenidos en esta variable oscilan entre 1.07 y 2.07, con un promedio de 1.45 y 1.67 (D.E. de 0.72 y 0.82) para los experimentos de Nayarit y Veracruz, respectivamente. Se observó una tendencia en ambos experimentos de aumentar gradualmente conforme transcurrió el tiempo (Figura 24), observándose una mayor dilatación de éstos tejidos a los 30 DDE en todos los tratamientos (1.7). Para el caso de los explantes provenientes de Nayarit las diferencias se observaron a partir de los 20 DDE, siendo 4-FAA el tratamiento con una mayor dilatación 1.43), al igual que en la fecha 30 (1.9). El sulfato de

adenina, alcanzó una dilatación en el explante estadísticamente parecida a la inducida por 4-FAA (1.68) (Figura 24 y 25 B y C). En el caso de los explantes provenientes de Veracruz, se observó una dilatación significativa desde los 10 DDE, en donde sulfato de adenina (1.66) y 4-FAA (1.82) promovió la mayor dilatación más prominente que el resto de los compuestos; sin embargo a los 20 y 30 DDE, 4-FAA es el tratamiento con un mayor índice de dilatación con respecto al resto de los tratamientos (2.07 y 1.93 respectivamente). Lo cual sugiere que aunque sulfato de adenina aparece en algunas fechas como uno de los compuestos que logra inducir una dilatación significativa, 4-FAA promueve mayor dilatación del cambium y floema para prácticamente todas las fechas de evaluación (10, 20 y 30 DDE) (Figuras 28 y 29). Tomando en cuenta que los explantes tienen diferente procedencia y que 4-FAA fue el tratamiento que más sobresalió, se infiere que la respuesta del explante está influenciada por los componentes del medio de cultivo (Mrogisnski y Roca, 1991). Almeida y colaboradores (2003 y 2006) también mencionan que la respuesta morfogénica de segmentos internodales y epicotilos de *Citrus sinensi* está en función del medio de cultivo, observándose un aumento en el diámetro y circunferencia del explante al suplementar el medio con auxinas y/o citocininas.

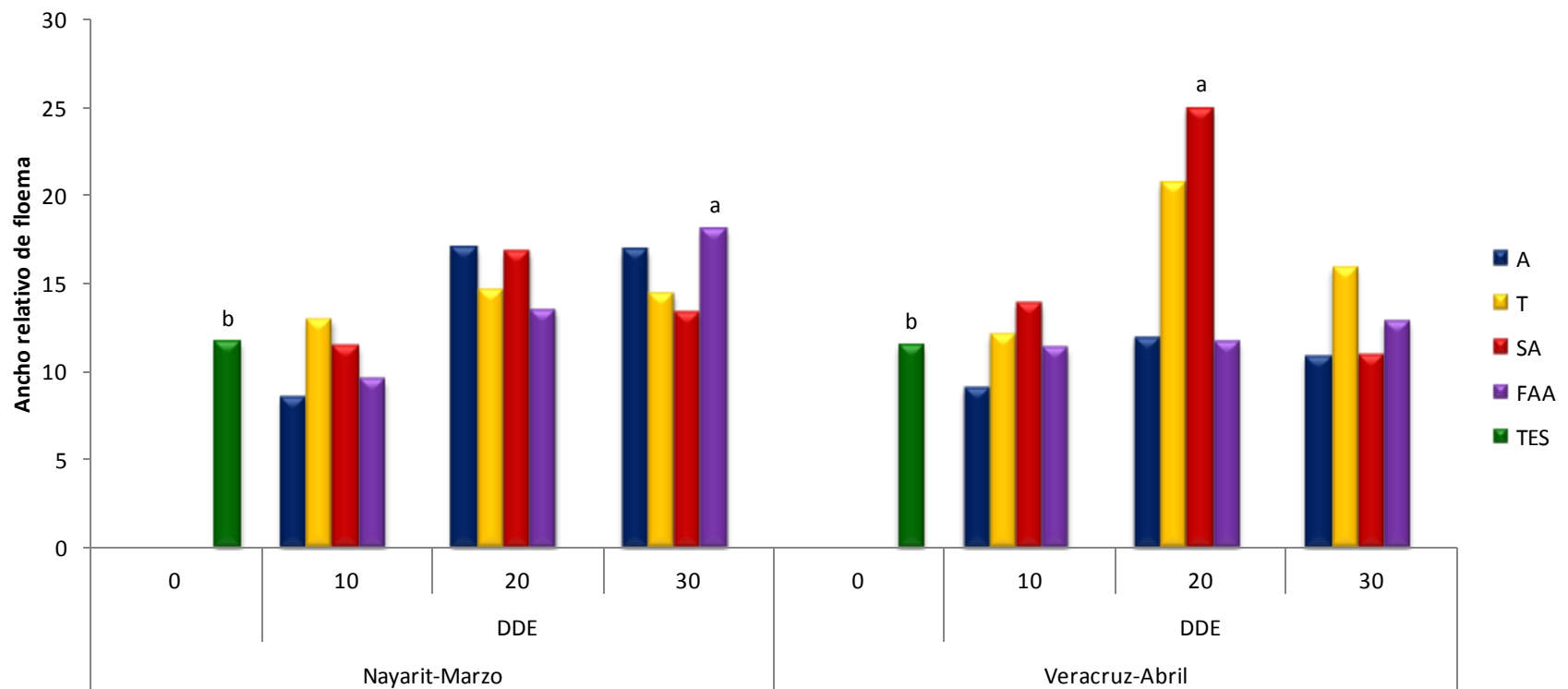


Figura 22. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el ancho relativo de floema (AF) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorfenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

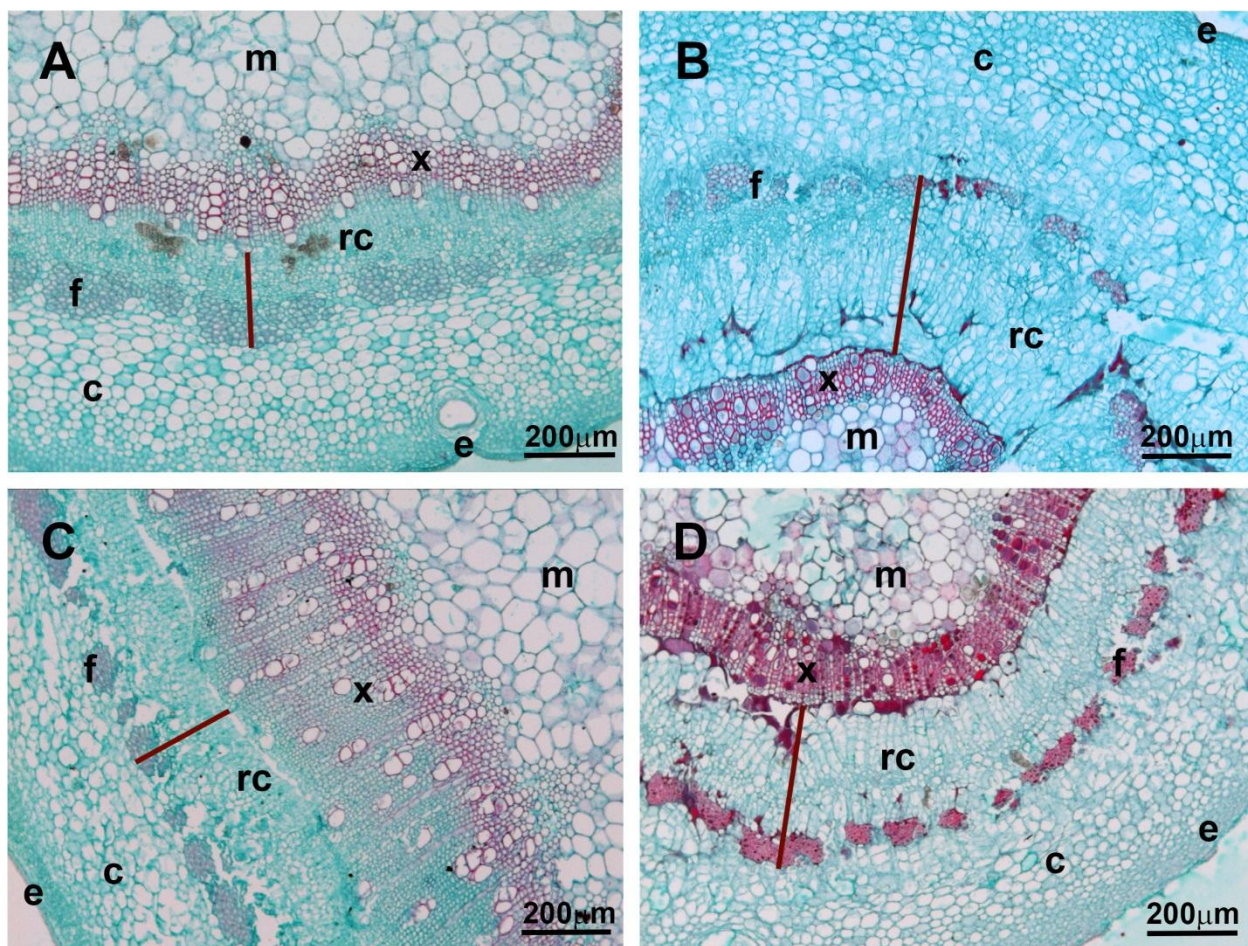


Figura 23. Cortes transversales de limón persa para la evaluación de ancho de floema (línea roja) de explantes provenientes de Nayarit A) testigo y B) 4-FAA a los 30 DDE); y Veracruz C) testigo y D) sulfato de adenina a los 20 DDE). e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

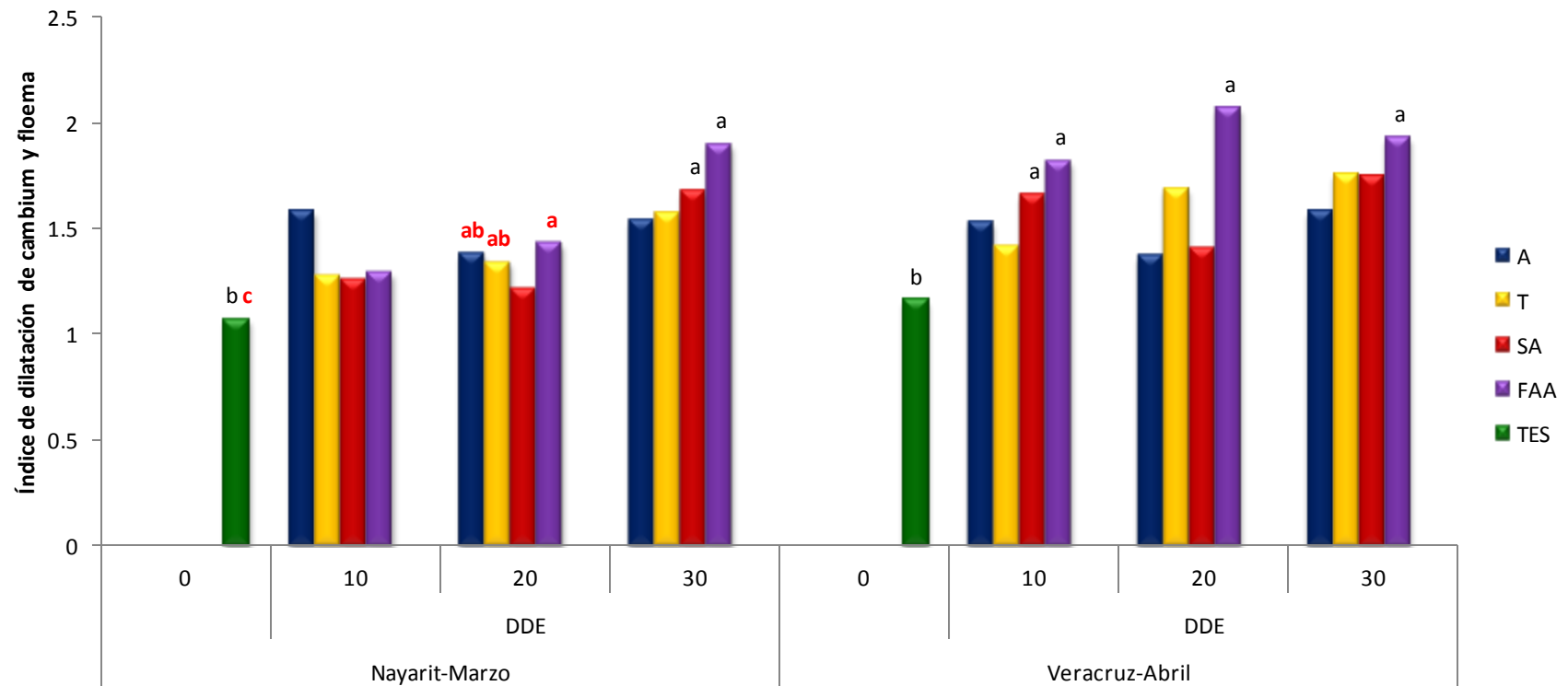


Figura 24. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el índice de dilatación de cambium y floema (DCF) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

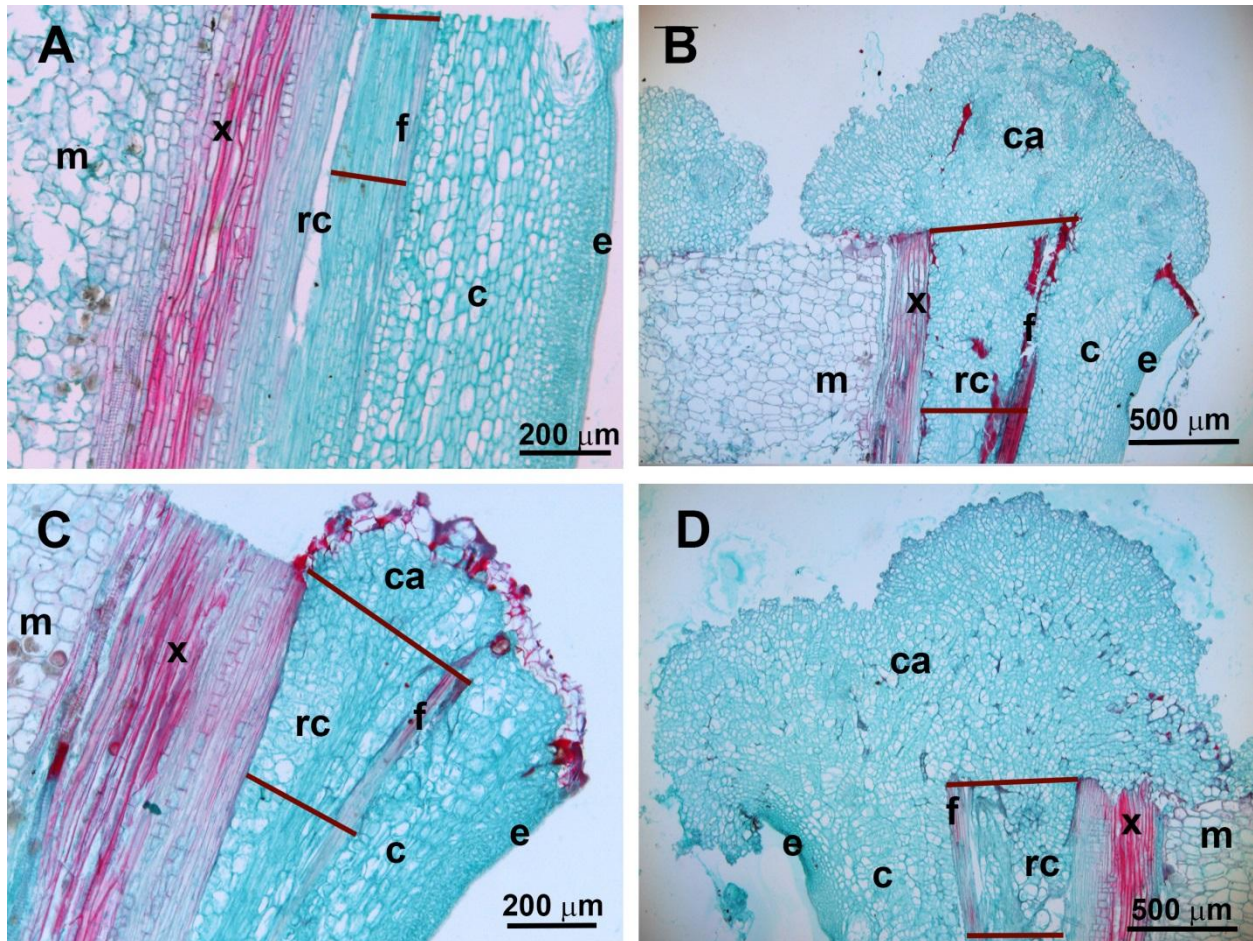


Figura 25. Cortes longitudinales de limón persa donde se observa una dilatación en la región del cambium y floema (línea roja) en explantes provenientes de medio MS suplementado con 4-FAA (B y D) y sulfato de adenina a los 30 DDE (C) en contraste con el testigo (A). Explantes de Nayarit (B y C); Veracruz (A y D). e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema, m-médula y ca-callo.

4.2.4 Xilema.

En el testigo se observó un xilema constituido principalmente elementos de vaso y fibras. Las fibras son células largas y muy lignificadas con terminación en forma de punta (cortes longitudinales) pero en corte transversal aparecen circulares pequeñas (cortes transversales) con paredes muy lignificadas. Los elementos de vaso, son células más anchas que las fibras (cortes transversales) y alargadas pero más cortas que las fibras (cortes longitudinales), la cantidad de estos tipos celulares es mayor en xilema

vascular que en el intervascular. En los tratamientos evaluados no se encontraron diferencias anatómicas.

Una de las variables evaluadas fue el diámetro de elementos traqueales de xilema fascicular, en la cual se obtuvieron diferencias significativas únicamente en los explantes de Veracruz a los 10 DDE, observándose una disminución en el tamaño de las células (Figuras 36 y 27). Los datos fluctuaron entre 1 y 2.1, con un promedio de 1.5 y 1.49 (D.E. 0.79 y 0.77) para Nayarit y Veracruz, respectivamente.

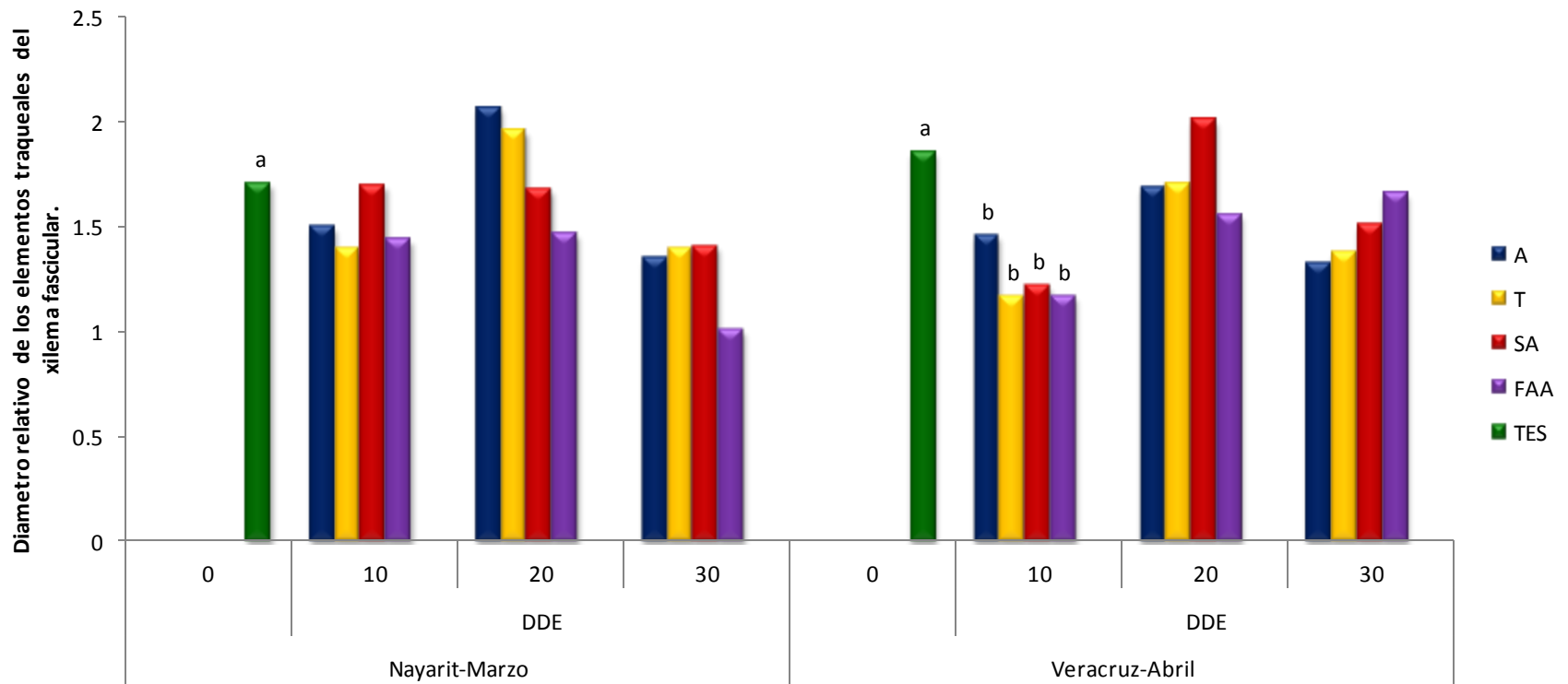


Figura 26. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el DTXF a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacantanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

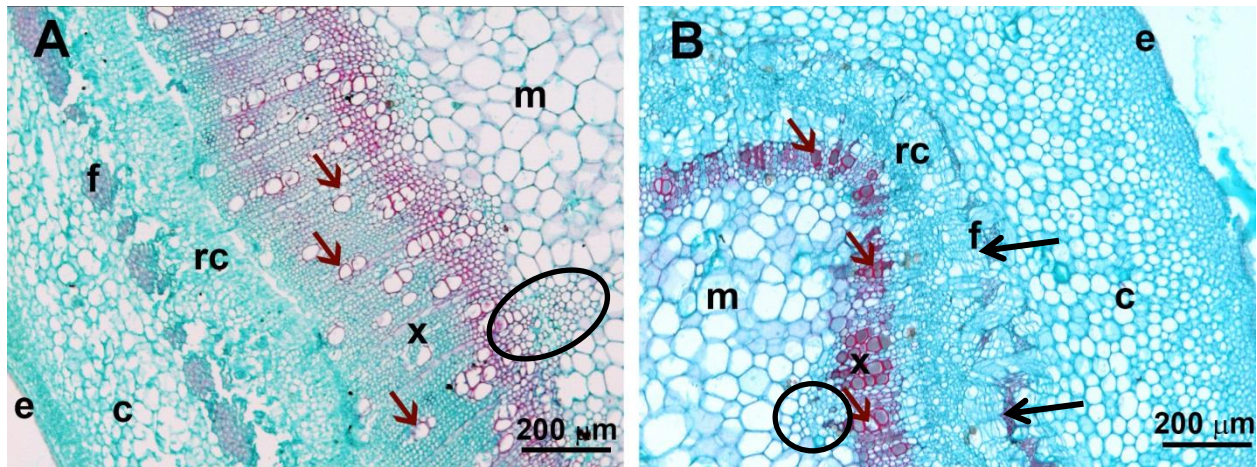


Figura 27. Cortes transversales de explantes internodales de limón persa, (procedentes de Veracruz) A) testigo y B) 4-FAA a los 10 DDE. Las flechas rojas indican los elementos de traqueales del xilema. Los círculos indican el xilema primario vea la reducción en la zona del xilema. Las flechas indican actividad meristemática caracterizada por divisiones periclinales. e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

Los valores de ancho relativo de xilema fascicular oscilan entre los 8 y 19, con un promedio de 12.22 (D.E. 6.37) para Nayarit y 11.53 (D.E. 6.30) para Veracruz. Los valores de esta variable fueron significativamente diferentes en ambos experimentos (Figura 28), aun cuando no se logró observar una tendencia clara del comportamiento de este tejido. En los explantes de Nayarit a los 30 DDE hubo mayor diferencia con respecto al testigo destacando sulfato de adenina con un mayor tamaño para esta variable (16.31) (Figuras 28 y 30B), mientras que para el experimento de Veracruz, a pesar de que hay diferencias significativas, el testigo es quien mantiene la mayor anchura relativa de xilema fascicular (18.98), ya que en el resto de los tratamientos en las diferentes fechas se observó una disminución del tamaño del tejido (Figuras 30 C y D), siendo los 20 DDE la única fecha de evaluación que se mantiene sin diferencias con respecto al testigo.

Otra variable evaluada en este tejido fue el número relativo de elementos traqueales de xilema fascicular, el cual osciló entre los 0.5 y 1.5, con un promedio de 0.79 y 0.67 (D.E. de 0.41 y 0.38) para los explantes de Nayarit y

Veracruz, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas para ambos experimentos (Figura 29), donde se observa que en explantes provenientes de Nayarit el tratamiento de sulfato de adenina a los 30 DDE, fue el único que mostró un incremento significativo en el número de células de xilema (Figura 30B) con aproximadamente 27 capas de células; mientras que en los explantes de Veracruz, ninguno de los tratamientos analizados fue superior al testigo, al contrario se observó una disminución en el número de células de xilema con respecto al testigo (Figuras 29 y 30 C y D), siendo 4-FAA a los 10 DDE el de menor tamaño (14 capas de células).

Con la finalidad de tener un estudio más completo se realizó la medición de una variable más, ancho relativo de xilema secundario interfascicular, en la cual se registraron valores entre 4 y 13, con un promedio de 7.77 y 7.57 (desviación estándar (D.E.) de 4.17 y 4.27) para los explantes de Nayarit y Veracruz, respectivamente. Para el experimento realizado con explantes provenientes de Nayarit, no se observaron diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 31), es decir, ocurrieron cambios en los explantes al utilizar los diversos compuestos, pero tales cambios no fueron estadísticamente significativos, mientras que para los explantes provenientes de Veracruz, se observaron cambios con respecto al testigo, observándose una disminución de hasta el 50% (Figuras 31 y 32), teniendo un promedio relativo de ancho de xilema de 12 en el testigo (aproximadamente 18 células) con respecto a 6-7 del resto de los tratamientos (8 células), observándose mayores diferencias en las fechas 10 y 30.

Debido a que los explantes tienen diferentes lugares de procedencia es posible que el contenido de fitohormonas y nutrientes contenidos en cada uno sea diferente, permitiéndoles a los explantes de Nayarit tener una mayor resistencia al proceso de desinfestación (contacto con etanol y cloro) además de una respuesta favorable al estar en contacto con los diferentes tratamientos,

teniendo valores iguales o mayores a los del testigo. En cambio los explantes provenientes de Veracruz se observaron con mayores modificaciones sobre todo a los 10 DDE, mostrando una disminución en el tamaño, en prácticamente todas las variables evaluadas en xilema, esto probablemente a una deshidratación a causa del contacto con el cloro y etanol.

Nieminen y colaboradores (2004) mencionan que hay diferentes genes implicados en la proliferación celular durante el desarrollo vascular por efecto de las auxinas y citocininas y que cualquier alteración o mutación de ellos puede modificar su actividad inhibiendo o incrementando el desarrollo de xilema y floema. Lo cual pudiera explicar en cierta parte las diferentes respuestas obtenidas en los experimentos al evaluar las diferentes variables en xilema. Estos autores mencionan que un alto nivel de auxinas puede mejorar la capacidad de transporte y promover diferenciación de tejido vascular. Lo anterior difiere de los resultados obtenidos en explantes provenientes de Veracruz 4-FAA (auxina) donde se identificó el menor número de células en xilema vascular; sin embargo, cabe señalar que las concentraciones de este compuesto eran muy bajas (0.2 mg L^{-1}). Los autores también mencionan que las células de xilema recién formadas tienen un proceso de expansión antes del establecimiento de la pared celular, lo cual podría explicar el aumento de tamaño de ancho vascular y el número de células encontrado a los 30 DDE en los explantes provenientes de Nayarit, ya que esta región tiene la capacidad de ir aumentando de tamaño de manera natural, por efecto de las divisiones provocadas por la región del cambium y floema. La variable ancho de xilema intervascular no tuvo diferencias significativas importantes en los explantes de Nayarit, debido a que este tejido no sufre modificaciones referente al aumento en diámetro, ya que una de las principales características del xilema es el desarrollo y deposición de pared celular secundaria, la cual está integrada por diferentes polímeros que le dan estabilidad y rigidez, impidiendo un aumento en el tamaño de este tejido (Nieminen *et al.*, 2004).

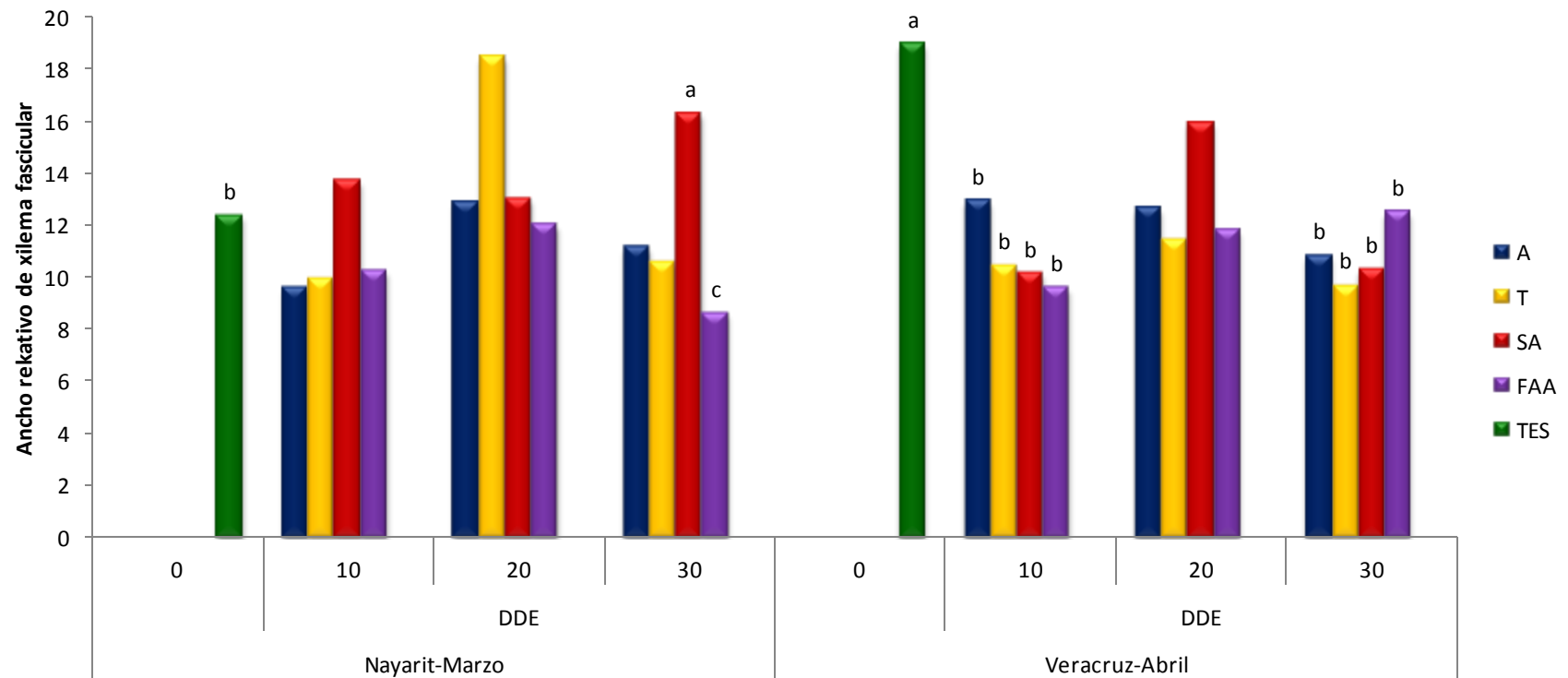


Figura 28. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el Ancho relativo de xilema fascicular (AXF) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

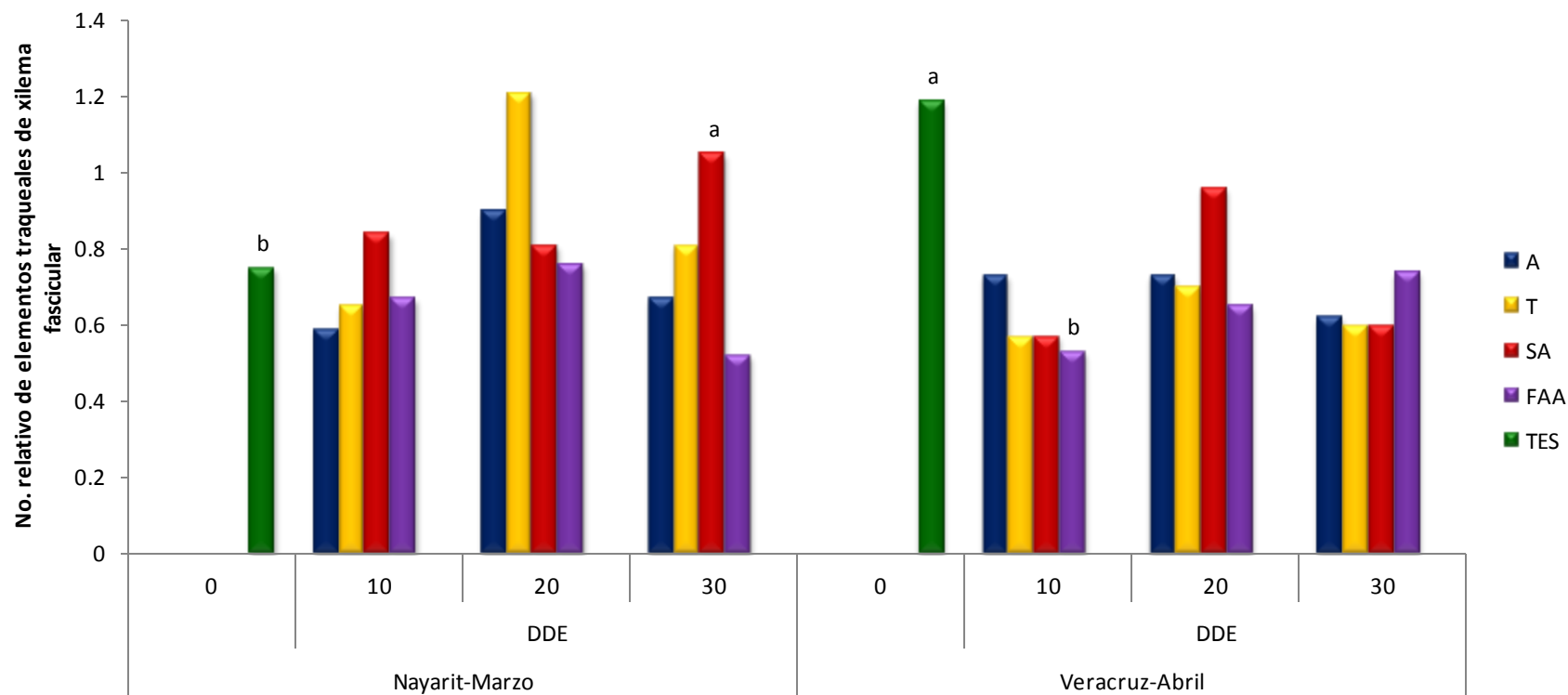


Figura 29. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el número relativo de elementos traqueales de xilema fascicular (TXF) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

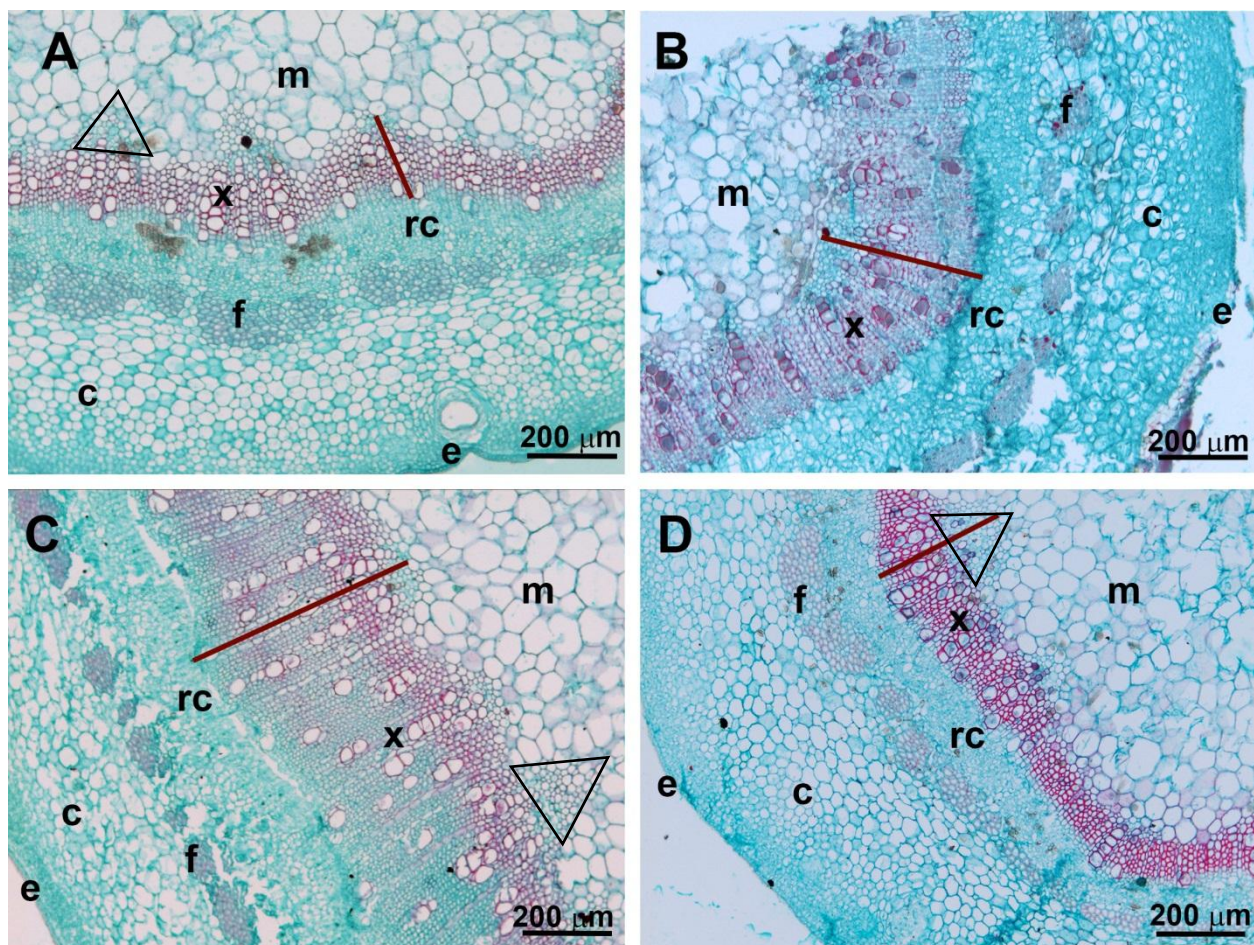


Figura 30. Cortes transversales de explantes de limón persa provenientes de Nayarit A) testigo y B) sulfato de adenina a los 30 DDE); y Veracruz C) testigo y D) 4-FAA a los 10 DDE). Los triángulos indican el xilema primario y las líneas rojas, ancho de xilema primario y secundario. e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

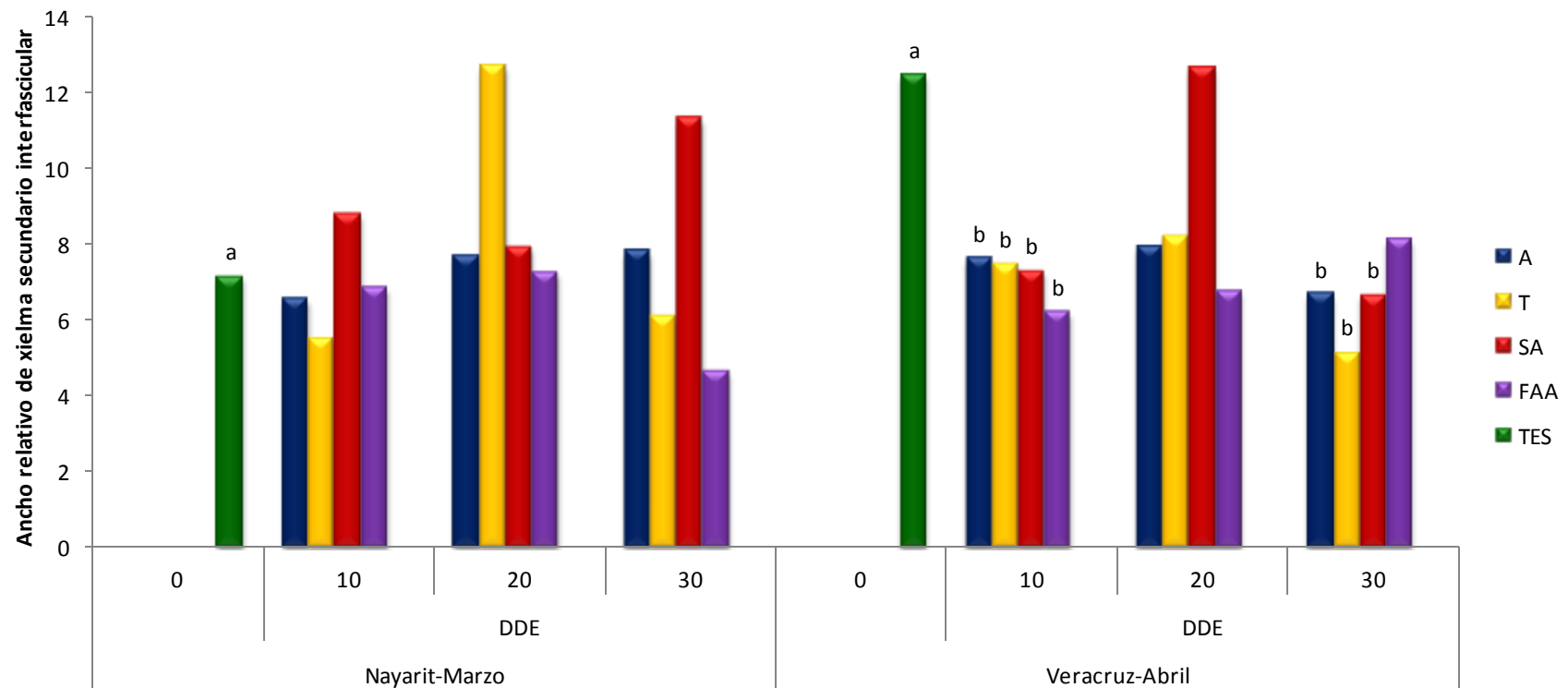


Figura 31. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre ancho relativo de xilema secundario interfascicular (AXIF) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

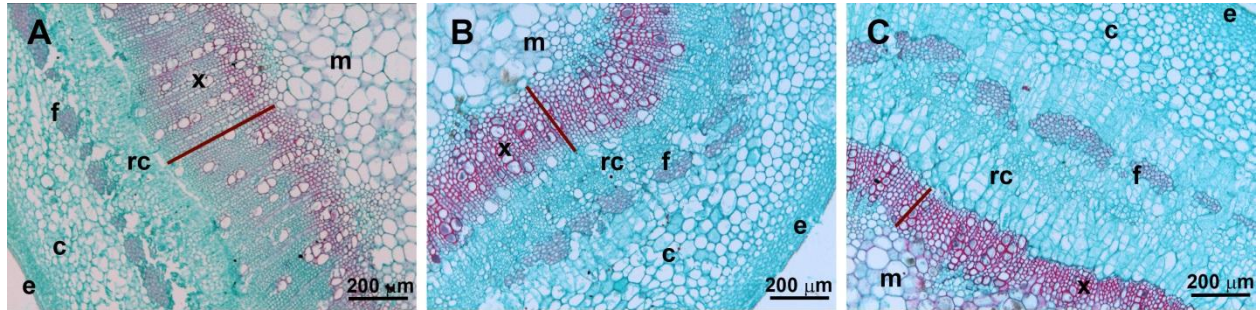


Figura 32. Cortes transversales de limón persa provenientes del estado de Veracruz. Ancho de xilema secundario interfascicular (línea roja) en: A) Testigo; B) adenina a los 10 DDE; y C) triacotanol a los 30 DDE. e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

4.2.5 Médula

En la médula del testigo se identificaron células grandes y poliédricas en la parte central, con espacios intercelulares y daños en algunas de ellas, las células próximas al xilema eran más pequeñas, circulares y sin espacios intercelulares. No se identificaron cambios anatómicos en este tejido en ningún tratamiento, pero se identificaron diferencias en tamaño (Figura 33) y presencia de cristales el tratamiento con sulfato de adenina y 4-FAA. La variación de datos obtenidos en el diámetro relativo de células de médula está entre 1.3 y 3.2, en explantes de Nayarit con un promedio de 2.04 y 2.03 para los de Veracruz con una desviación estándar de 1.12 para ambos. Las diferencias con respecto al testigo se encontraron para ambos a los 10 y 30 DDE, observándose una disminución del tamaño de células (Figuras 33 y 34) de hasta el 50% en prácticamente todos los tratamientos, lo que indica que a los 10 DDE la disminución del tamaño pudo deberse a una actividad en la división celular produciendo células jóvenes pequeñas.

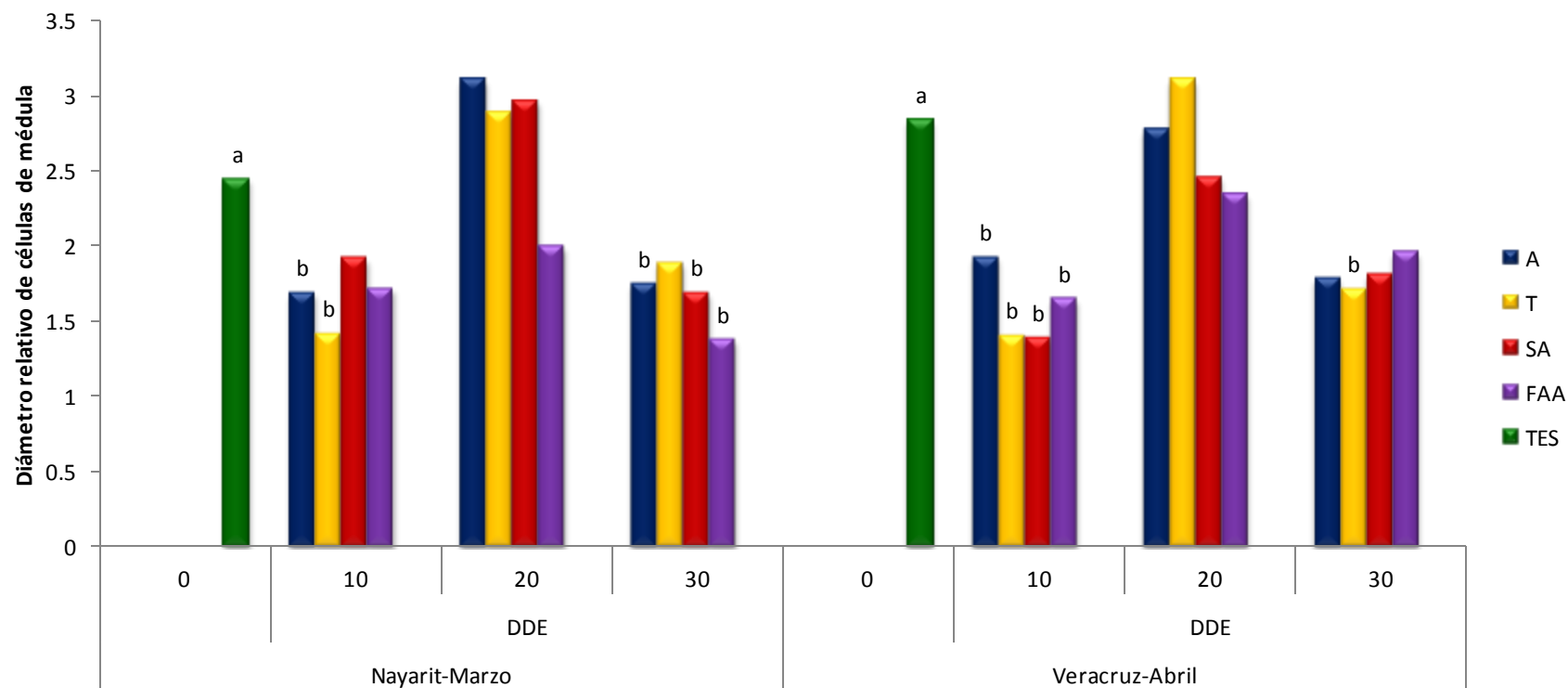


Figura 33. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el diámetro relativo de células de médula (DCM) a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

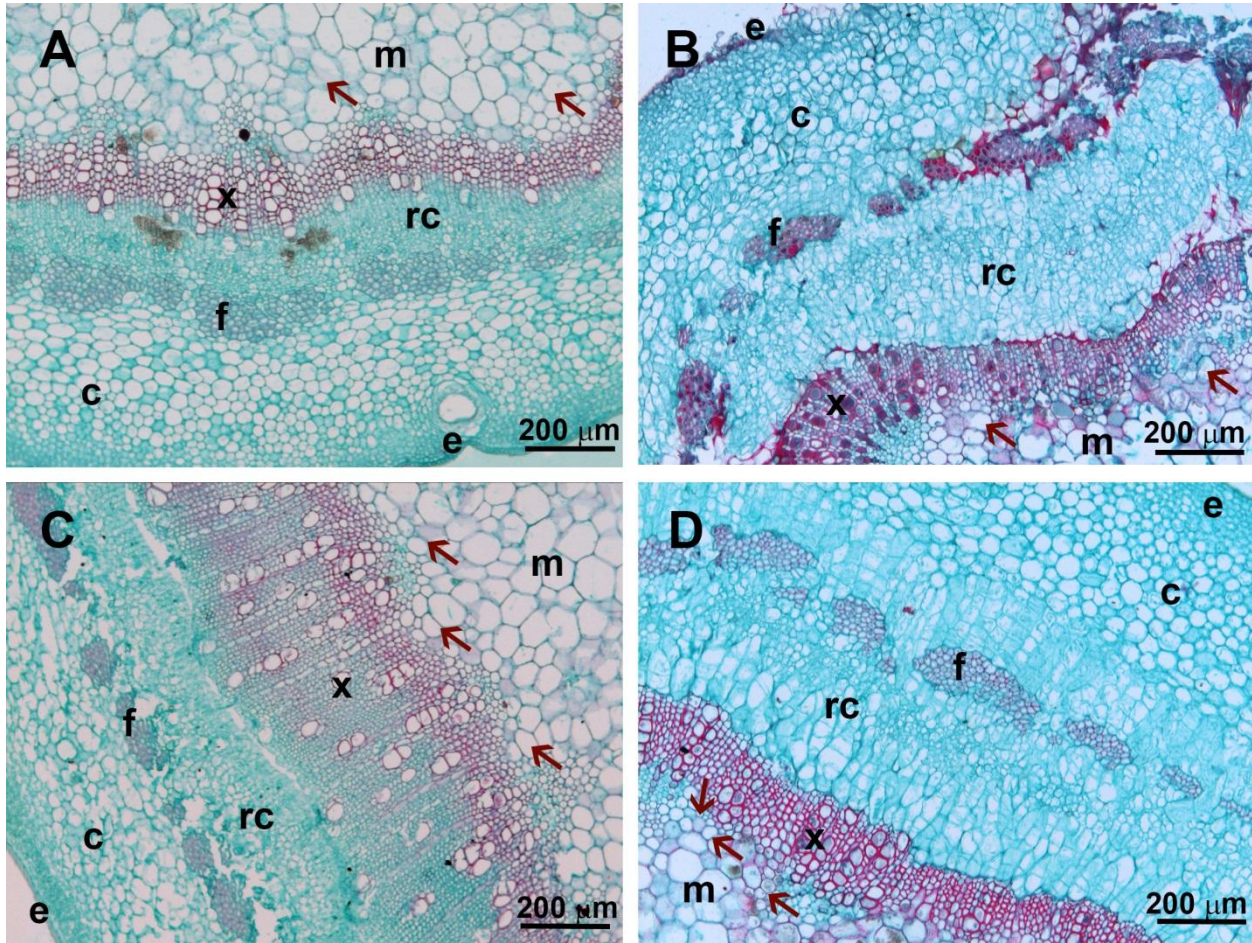


Figura 34. Cortes transversales de limón persa para la evaluación del diámetro de células de médula (flechas) de explantes provenientes de Nayarit A) testigo y B) adenina a los 30 DDE; y Veracruz C) testigo y D) triacanolol a los 30 DDE). e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema y m-médula.

4.2.6 Callo.

El callo es un tejido que se originó a partir de las divisiones periclinales y anticlinales de parénquima de floema, células del cambium y en el caso de 4-FAA provenientes también del parénquima cortical (corteza). Estas divisiones dieron origen a células parenquimáticas, las cuales tienen las características de ser plásticas, totipotentes y por ende con la capacidad de dar origen a brotes adventicios en segmentos internodales. La variable evaluada en este tejido fue la altura del callo y la formación de puntos meristemáticos. La variable altura de callo no se sometió al análisis de datos, dado que la formación de callo fue

inducida por los compuestos y no por el tamaño del explante, el rango de valores fue de 34.5 a 1087.5 μm con un promedio de 248.99 y 476.73 μm (D.E. de 269.90 y 305.26) para Nayarit y Veracruz, respectivamente. Se encontraron diferencias en explantes de Nayarit y Veracruz (Figura 35) observándose que la formación de callo se da a partir de los 10 DDE, que en los tratamientos de adenina, sulfato de adenina y triacontanol había formación de callo en prácticamente todos los explantes, aunque no todos lograban sobresalir de la superficie del corte (50%), considerándose como altura cero. Las diferencias fueron en prácticamente todas las fechas evaluadas, a excepción de los 10 DDE en explantes provenientes de Nayarit, el valor máximo se obtuvo a los 30 DDE donde 4-FAA indujo un callo de mayor tamaño, 957 μm para Nayarit y 1087 μm para Veracruz (Figuras 35 y 36). Esto indica que este compuesto induce división celular acelerada, dando origen a la formación de un callo, predominaron las divisiones periclinales en todos los tratamientos. En el tratamiento de 4-FAA se detectó la formación de puntos meristemáticos en diferentes zonas del callo, así como algunas esclereidas. En los tratamientos de adenina, triacontanol y sulfato de adenina se identificó la formación de suber en la superficie del callo (Figura 36). En la mayoría de los casos el callo no cubrió la superficie del explante, con excepción de 4-FAA, a los 20 días el callo cubrió la médula, y a los 30 DDE el callo cubrió la superficie del explante producto de la intensa división celular (Figura 36).

Existen actualmente diferentes especies que se han analizado mediante estudios histológicos para ver la respuesta morfogénica del explante (segmentos internodales y epicotilos) utilizando diferentes fitohormonas en el medio de cultivo (BAP, ANA), en los cuales se ha observado la formación de callo, proveniente de células del cambium, originado principalmente por divisiones periclinales (García-Luis *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Tavano *et al.*, 2009). Esos resultados son comparables a los obtenidos en este trabajo de investigación, sin embargo cabe

resaltar que los explantes utilizados en estas especies (*Citrus sinensis*, Troyer citrange y Carrizo citrange) provienen de semillas germinadas *in vitro*, por lo que el uso de BAP y ANA son suficientes para inducir la formación de callo. En el presente trabajo al utilizar segmentos internodales de limón persa (*Citrus latifolia*) (cítrico característico por carecer de semillas) provenientes de árboles maduros, el uso de citocininas y auxinas comunes a las concentraciones utilizadas no fue suficiente para la formación de callo. Peña y colaboradores (2004), mencionan que un medio con auxinas (además de las auxinas endógenas) favorece y acelera la formación de callo, lo cual concuerda con nuestros resultados en donde al utilizar 4-FAA (compuesto de tipo auxínico), se favoreció la formación de callo tanto en explantes provenientes de Nayarit como de Veracruz, lo cual indica para esta variable que el medio de cultivo, juega un papel muy importante en el desarrollo de callo.

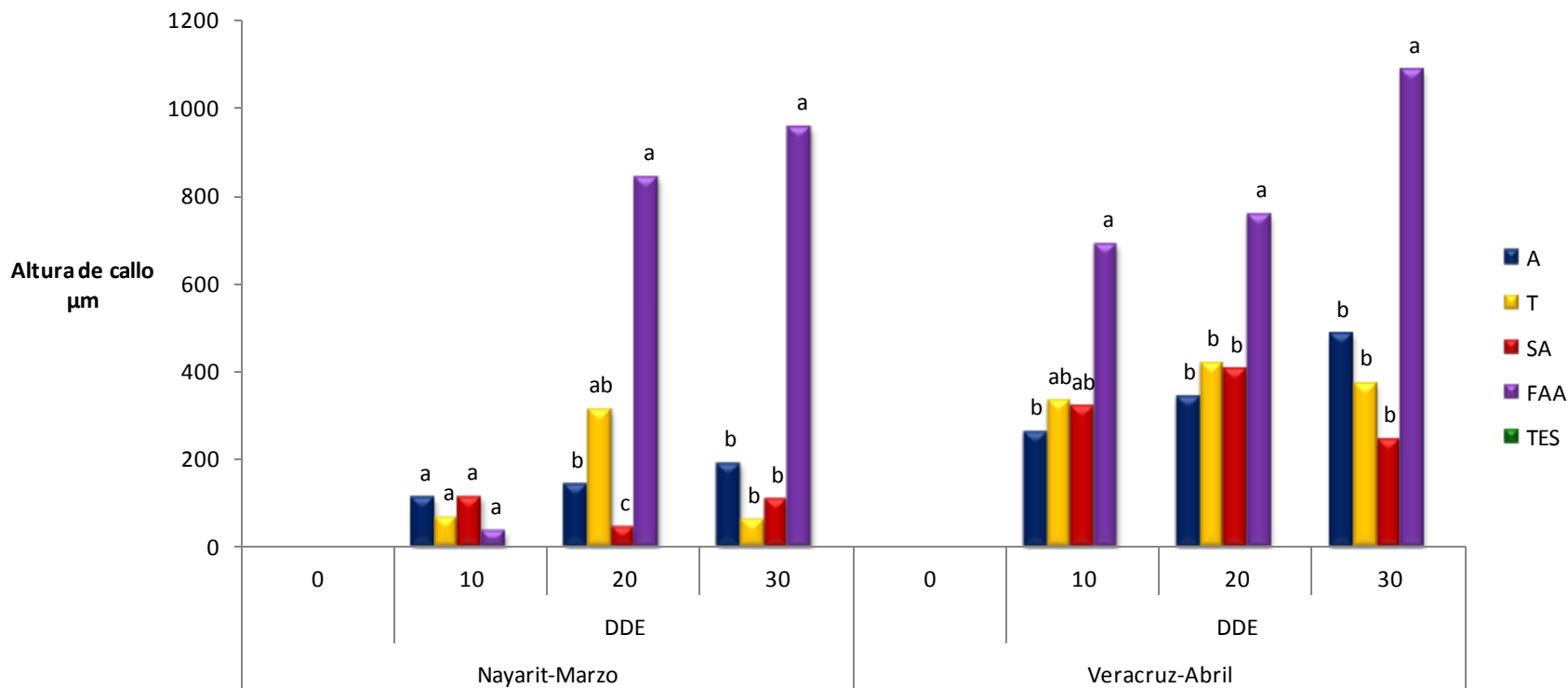


Figura 35. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre AlCa a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacantanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

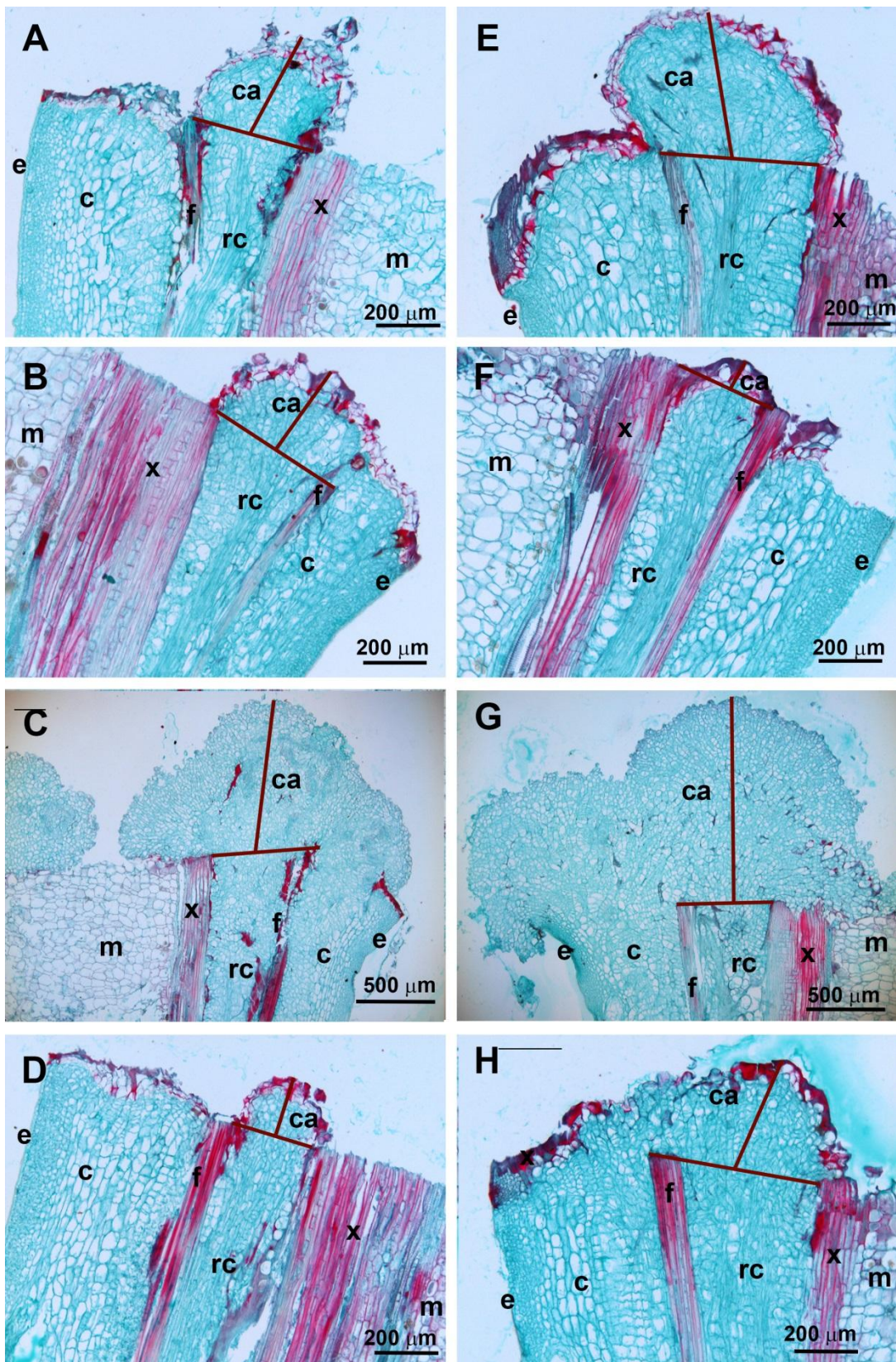


Figura 36. Cortes longitudinales de limón persa donde se observa formación de callo a los 30 DDE bajo el efecto de cuatro compuestos diferentes en explantes provenientes de Nayarit (A-D) y Veracruz (E-H). Adenina (A y E); sulfato de adenina (B y F); 4-FAA (C y G) y triacontanol (D y H). e-epidermis, c-corteza, f-floema, rc- región del cambium, x-xilema, m-médula y ca-callo.

4.2.7 Regiones meristemáticas

Otra variable evaluada en callo además de la altura fue la formación de regiones meristemáticas. Estas regiones consisten en el agrupamiento de pequeñas células isodiamétricas de paredes delgadas, con núcleos prominentes y citoplasma denso, formadas tanto en zonas centrales como periféricas (Figura 38, 39 y 40), aunque mayormente (alrededor del 70% de los puntos) en zonas periféricas lo que facilitaría la formación de brotes adventicios. Fue posible identificar estas regiones meristemáticas a partir de los 20 DDE (Figura 37) en tres de los tratamientos en los explantes de Nayarit, adenina, sulfato de adenina y principalmente en 4-FAA (Figura 38). Cabe mencionar que en adenina y sulfato de adenina únicamente se encontró un punto meristemático en todas las imágenes evaluadas. El promedio de regiones meristemáticas identificados en 4-FAA corresponde a 5.88 para los explantes provenientes de Nayarit y 4.87 para aquellos provenientes de Veracruz, en donde el valor máximo obtenido fue en explantes de Nayarit (7.42 regiones meristemáticas por corte); a los 30 DDE se alcanzaron valores de hasta 30 regiones por explantes en Nayarit y 8.5 en explantes de Veracruz. Estos resultados indican que la formación de regiones meristemáticas se ve favorecida por el efecto de 4-FAA aunado a la procedencia del explante (Nayarit), lo que sugiere que utilizar explantes de este lugar en el mes de marzo bajo el efecto de 0.2 mg L^{-1} de 4-FAA aumenta las posibilidades de obtener estas estructuras para la formación de brotes adventicios. Regiones meristemáticas se encontraron en otras especies de cítricos, en los que se observó la formación de pequeños grupos de células, con citoplasma denso y núcleo prominente entre los 9-15 días, las cuales dieron origen a brotes adventicios (García-Luis *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Tavano *et al.*, 2009). Sin embargo al igual que en la formación de callo, estas especies provienen de explantes obtenidos a partir de semilla germinadas *in vitro* las cuales tiene la capacidad de formar estas regiones en menos días, comparado con las

formadas por limón persa hasta los 20 DDE, posiblemente por el grado de madurez de los tejidos.

Es importante señalar también que la procedencia del explante (Nayarit y Veracruz) influye en la respuesta de esta variable, ya que fue en los explantes provenientes de Nayarit donde se encontró una gran cantidad de regiones meristemáticas, influenciado posiblemente por el manejo del huerto y/o condiciones ambientales.

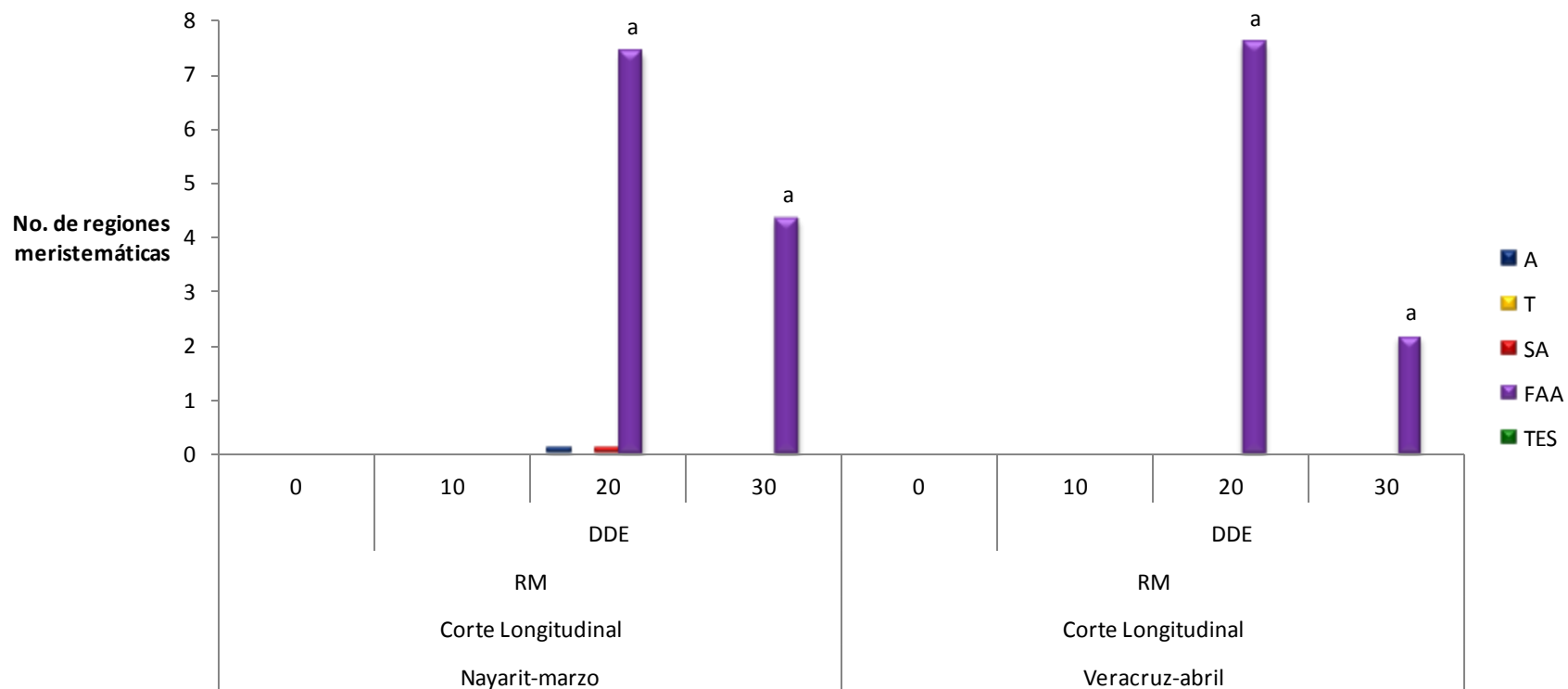


Figura 37. Efecto de precursores de fitohormonas y activadores de la división celular sobre el número de RM a los 10, 20 y 30 DDE. A: adenina; SA: sulfato de adenina; T: triacontanol y 4-FAA: ácido-4-fluorofenoxiacético. Barras con letras diferentes entre experimentos indican diferencias significativas con respecto al testigo, barras sin letra indican que son iguales al testigo. Tukey $\alpha=0.05$.

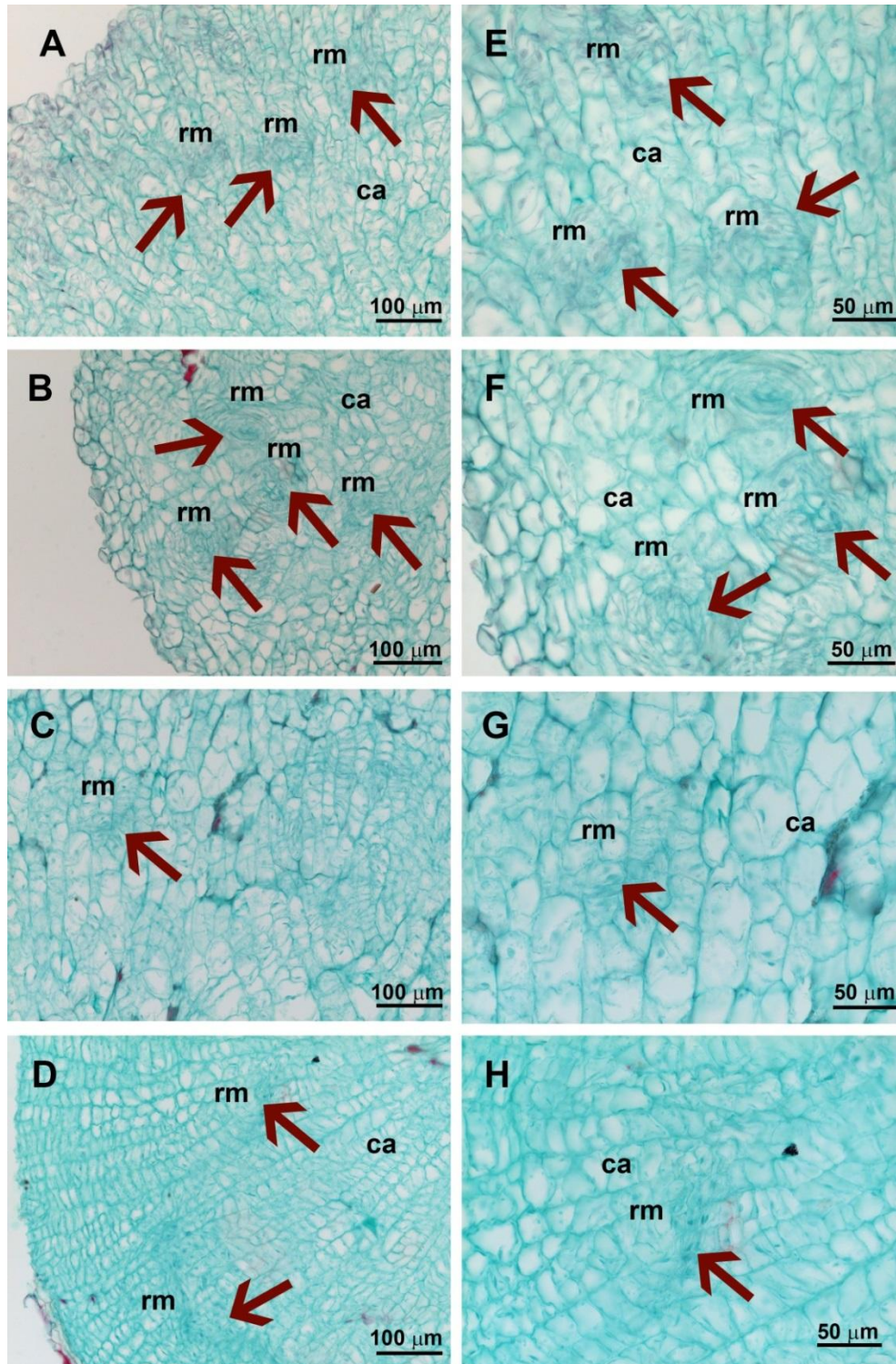


Figura 38. Cortes longitudinales de limón persa del tratamiento de 4-FAA a los 20 (A, C, E, G) y 30 (B, D, F, H) DDE, con formación de regiones meristemáticas en explantes de Nayarit (A, B, E, F) y Veracruz (C, D, G, H). ca- callo y rm- región meristemática.

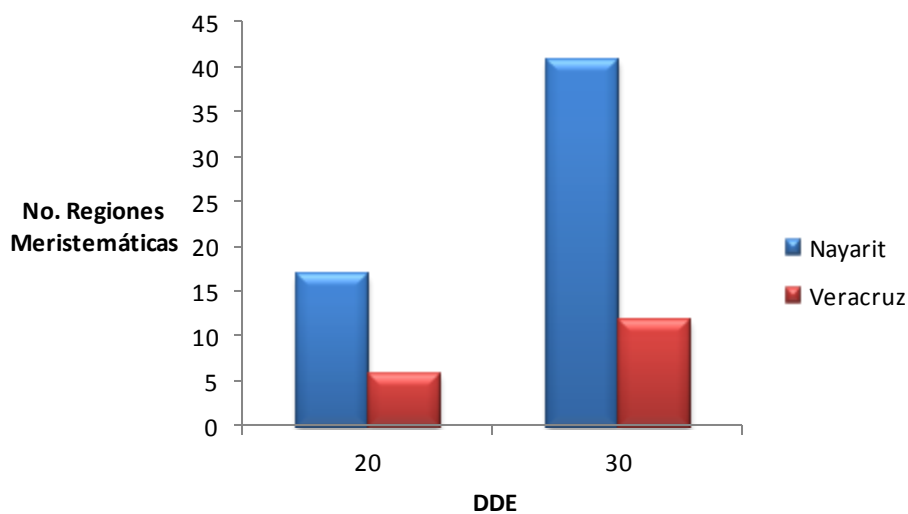


Figura 39. Frecuencia de regiones meristemáticas en explantes cultivados en 4-FAA, en la zona central del callo a los 20 y 30 DDE.

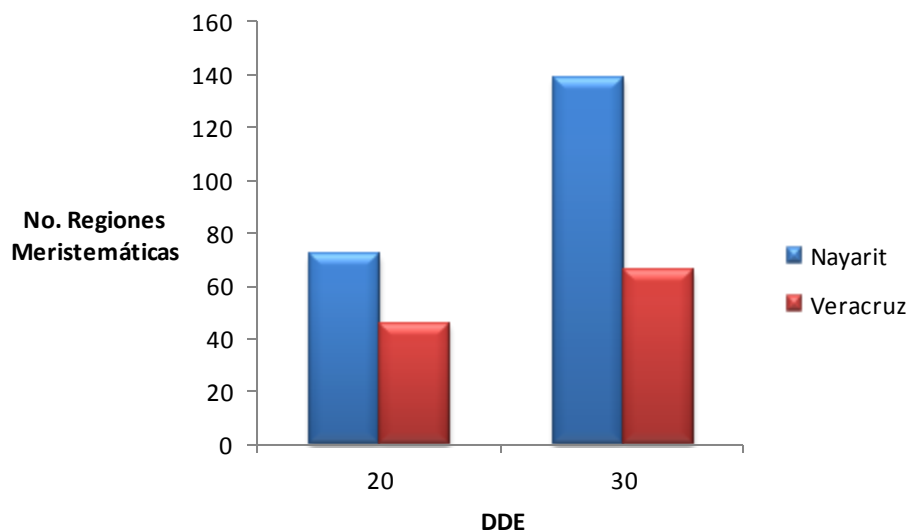


Figura 40. Frecuencia de regiones meristemáticas en explantes cultivados en 4-FAA, en la periferia del callo a los 20 y 30 DDE.

Se realizó una prueba de T para identificar si había diferencias significativas entre las diferentes zonas en las que se encontraron estas células meristemáticas, tratando de explicar la tendencia espacial de esta variable en el callo. En la prueba se observó que la mayor cantidad de estas regiones se ubican en la periferia del callo, con una media de 23.16

en la periferia y 6.83 en la parte central de explantes de Nayarit, mientras que en explantes de Veracruz la media fue de 11 para la periferia y 2 para la zona central (Figura 41), Actualmente, no existen antecedentes que describan la distribución espacial de las regiones meristemáticas en el callo, sin embargo en estos resultados se indica que existe una tendencia a formar regiones meristemáticas mayormente en la periferia, resaltando que fue en los explantes provenientes de Nayarit donde se observó una mayor diferenciación de estas zonas meristemáticas. Estos resultados coadyuvan a vislumbrar un buen panorama para la formación de brotes adventicios bajo un estímulo adecuado de fitohormonas, precursores de fitohormonas o compuestos que favorezcan la brotación adventicia, ya que se encuentran casi expuestos en la superficie, favoreciendo su formación y exposición por encima de la superficie del callo.

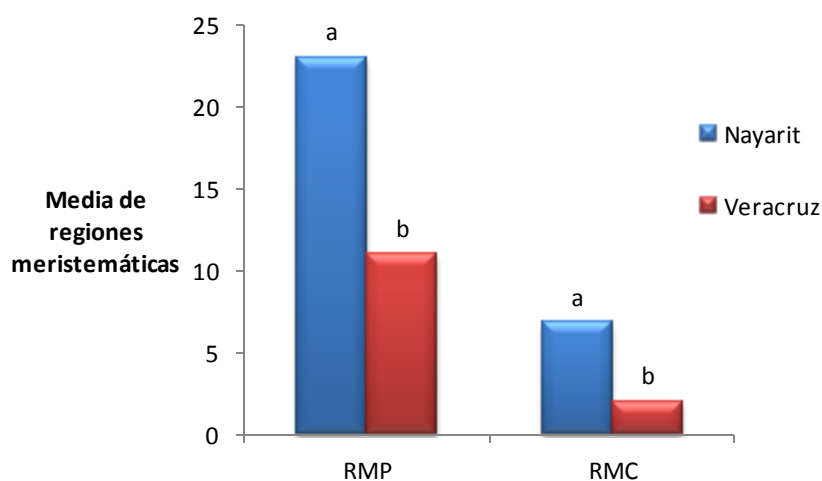


Figura 41. Regiones meristemáticas en 4-FAA, en la zona central y periférica del callo identificadas desde los 20 DDE en explantes provenientes de Nayarit y Veracruz. Prueba de T $\alpha=0.05$, columnas con letras diferentes indican diferencia significativa.

4.2.8 Meristemos en fila.

La formación de meristemos en fila se identificaron en ambos experimentos, únicamente en el tratamiento de 4-FAA, a partir de la fecha 20, posiblemente asociado a que en esta fecha el tamaño del callo es más grande y empiezan a aparecer estas estructuras que por definición son un conjunto de células cuyos planos de división son paralelos a la superficie (periclinales) produciendo hileras de células que aumentan el tamaño del callo. Los porcentajes obtenidos que indican la formación de estas estructuras correspondieron a un 67% para explantes de Nayarit (Figura 42) y 56% para explantes provenientes de Veracruz (Figura 43).

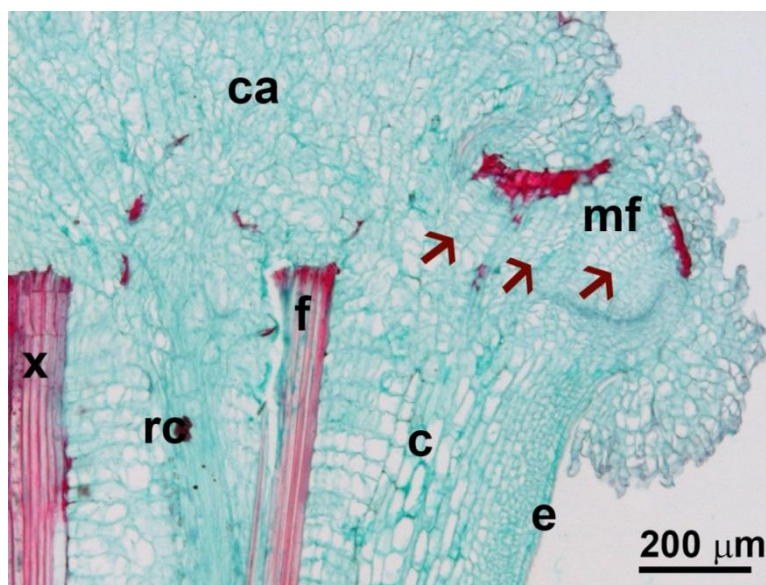


Figura 42. Meristemos en fila identificados en explantes de Nayarit, provenientes del tratamiento 4-FAA a los 20 DDE

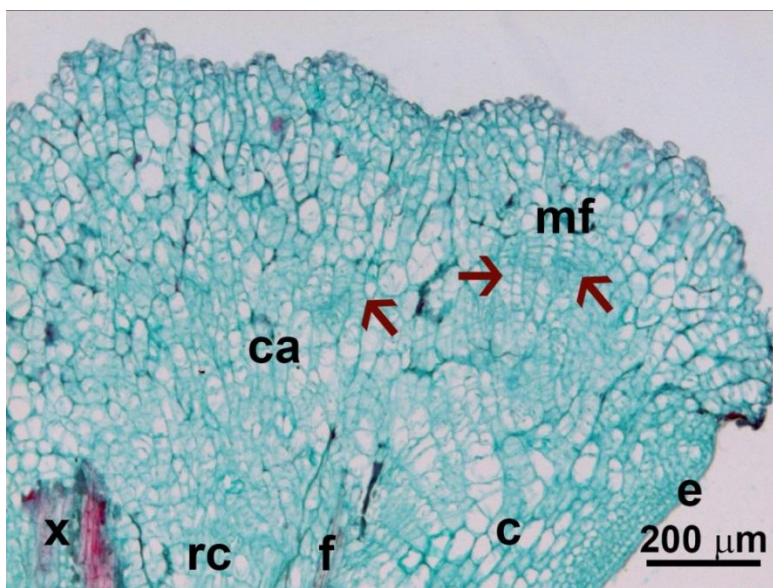


Figura 43. Meristemos en fila identificados en explantes de Veracruz, provenientes del tratamiento 4-FAA a los 20 DDE

4.2.9 Brotes adventicios.

La brotación adventicia es el resultado de un gran número de factores interactuando al mismo tiempo, factores como el tipo de explante, procedencia del explante, medios de cultivo, reguladores del crecimiento, luz, temperatura, entre otros. Evidentemente lograr la sincronización de todos estos factores para inducir la brotación adventicia constante resulta una tarea titánica; sin embargo la formación de brotes son fundamentalmente para la aplicación de técnicas biotecnológicas como la transformación genética. Mediante esta investigación se logró la obtención de cinco brotes adventicios, cuatro formados en sulfato de adenina y adenina (80 mg L^{-1}) y uno más identificado mediante el estudio histológico realizado a un explante de Veracruz a los 20 DDE contenido en medio MS suplementado con adenina (100 mg L^{-1}) (Figura 44). La formación del brote proviene de células meristemáticas localizadas en la zona del cambium, células parenquimáticas del floema y divisiones celulares de las células de parénquima de corteza. Se pudo observar que la epidermis del explante y

parte de la corteza sufrieron daños para dar paso a la formación del brote, en el cual aún no se percibe diferenciación del tejido vascular, lo cual comprueba que efectivamente es un brote adventicio. El brote está compuesto por dos pares de primordios foliares así como una estructura bien diferenciada en forma de domo apical. A diferencia de otros estudios donde la formación de brotes adventicios se observa a partir de los 30 DDE (García-Luis *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004; Tavano *et al.*, 2009) en esta investigación se identificaron a partir de los 20 días después de estar en contacto con adenina (precursor de crecimiento del tipo de las citocininas). Lo anterior coincide con lo obtenido por Almeida y colaboradores (2006), donde en epicotilos de *Citrus sinensis* a los 20 días se observó el desarrollo de brotes adventicios, provocando una desintegración de la epidermis y dando origen a la yema preformada por efecto del BAP. Estos resultados sugieren que al modificar las concentraciones de adenina y sulfato de adenina, se pueda provocar un efecto favorable y obtener mayor porcentaje de brotación.

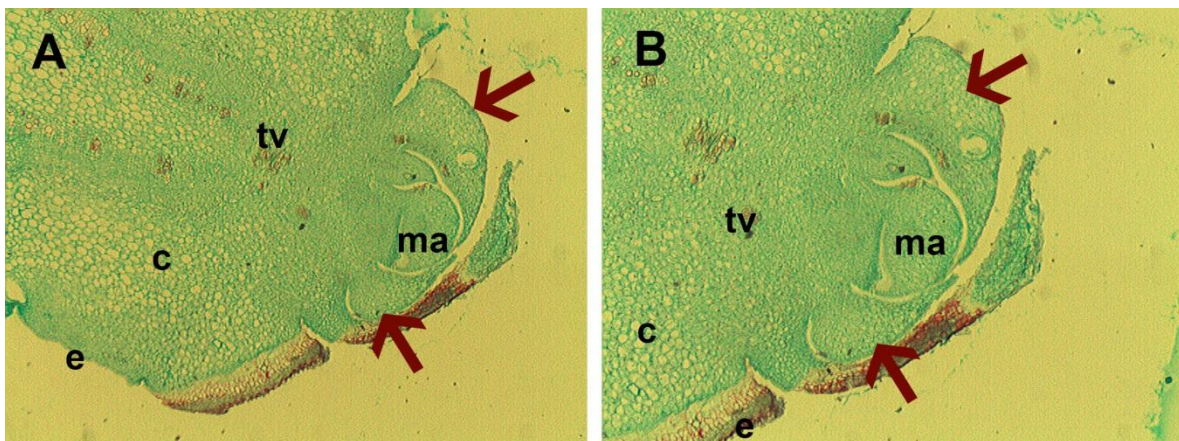


Figura 44. Corte transversal donde se observa la formación de un brote adventicio, proveniente del medio MS suplementado con adenina a 100 mg L^{-1} a los 20 DDE. e-epidermis, c-corteza, tv-tejido vascular, ma-meristemo apical, primordios foliares (flechas).

4.3 Variables relacionadas con la formación de brotes adventicios.

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación sugieren que la formación de brotes adventicios estaba íntimamente relacionado principalmente con cuatro características: ancho relativo de floema (AF), índice de dilatación del tejido vascular (DTV), altura de callo (AlCa) y finalmente la formación de regiones meristemáticas (RM).

Para comprobar si efectivamente estas variables están relacionadas, se utilizaron datos de los dos experimentos (Veracruz y Nayarit) bajo la consideración que el establecimiento *in vitro* de los experimentos fue en las mismas condiciones. Se realizó un análisis estadístico de Coeficiente de Correlación de Pearson entre variables de ambos experimentos con el procedimiento PROC CORR de SAS® versión 9.0.

De acuerdo a los resultados se determinó que existe correlación directa de DTV con AF y RM (0.85 ($P < 0.0001$) y 0.50 ($P < 0.013$) respectivamente) (Cuadro 4). Trabajos en los que se estudiaron los cambios morfológicos en *Citrus sinensis* inducidos por citocininas y auxinas (BAP y ANA), mencionan que observaron un aumento en el tamaño del explante (Almeida *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2003). Aun cuando no puntualizan en que zona específica del explante se observó el aumento, comentan que ese crecimiento fue por efecto de activas divisiones periclinales de células del cambium, por lo que se puede inferir que el aumento fue a nivel de cambium y floema, induciendo dilatación de esta región. Actualmente no hay reportes que hablen de la identificación y relación de estas variables con la formación de brotes adventicios, pero se menciona en algunos trabajos que antes de la formación del brote, se observó presencia de callo, el cual provenía de la zona del cambium a través de un gran número de divisiones, las cuales dieron lugar a un aumento en el tamaño del diámetro del explante (dilatación del tejido

vascular) (Almeida *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que para la formación y crecimiento de callo, deben existir cambios internos (cambium y floema) en el explante original.

Entre las variables altura de callo y regiones meristemáticas se esperaría que existiera alguna correlación; sin embargo, se obtuvo un valor de -0.30 ($P > 0.01$) (Cuadro 4) lo que indica que no existe correlación entre éstas variables y al ser negativo sugiere un efecto inverso entre ellas, es decir, que a mayor altura del callo sea menor el número de regiones meristemáticas. No obstante el análisis anatómico mostró que únicamente en aquellos callos donde la altura estaba por encima de los 400 μm se podían observar la formación de puntos meristemáticos. La formación de regiones meristemáticas requiere más que un callo de altura considerable, un compuesto que sea capaz de inducir una división celular activa para dar origen a células meristemáticas que agrupadas den lugar a regiones meristemáticas y a brotes adventicios. Algunos autores, mencionan que el uso de fitohormonas adecuadas (auxinas y/o citocininas) es crítico para la generación de callo, la formación de regiones meristemáticas y brotes adventicios (García-Luis *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2004). Para el resto de las variables no se encontró una correlación clara.

Cuadro 4. Coeficientes de correlación Pearson, N = 24 Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0.

	AF	DTV	AlCa	RM
AF	1.00000	0.85781 <0.0001	-0.06425 0.76550	0.37854 0.06820
DTV		1.00000	-0.12747 0.55280	0.50029 0.01280
AlCa			1.00000	-0.30841 0.1426
RM				1.00000

Con la finalidad de identificar el mejor tratamiento en las variables ancho de floema, índice de dilatación del tejido vascular y altura de callo, se realizó un análisis estadístico llamado área bajo la curva (ABC), el cual consiste en la incorporación de todos los datos mediante un análisis a través del tiempo, arrojando como resultado una gráfica en la que se genera un área bajo la curva diferente en cada tratamiento, resultando como mejor aquel cuya área haya sido la mayor comparada con el resto de los tratamientos (Anexo IV). Mediante este análisis se identificó que 4-FAA y sulfato de adenina fungen como los mejores tratamientos. Para el ancho relativo de floema en explantes proveniente de Veracruz, el tratamiento de sulfato de adenina fue el mejor (Cuadro 5), mientras que el tratamiento de 4-FAA lo fue para índice de dilatación del tejido vascular (explantes de Veracruz) y altura de callo (explantes de Nayarit y Veracruz) (Cuadros 6 y 7). Estos resultados muestran que factores como medio de cultivo y procedencia del explante (Veracruz y/o Nayarit), son capaces de inducir cambios significativos en las variables relacionadas con la obtención de brotes adventicios, tal y como lo menciona (Mrogisnski y Roca, 1991).

Los resultados de la presente investigación concuerdan con lo obtenido por Peña y colaboradores (2004) quienes comentan que un medio suplementado con auxinas (2,4-D) induce una rápida formación de callo en naranja dulce, pero el uso de BAP después de esta inducción de callo favorece división celular y diferenciación de brotes adventicios, lo que sugiere que uso de citocininas y auxinas favorece el desarrollo de brotes adventicios. En contraste, en otros trabajos la aplicación de auxinas para la inducción de callo tiene una baja respuesta por parte del explante y el uso de citocininas favorece dicha desdiferenciación (García-Luis *et al.*, 1999).

Cuadro 5. Evaluación de los tratamientos mediante el análisis de ABC en la variable ancho de floema.

Tratamiento	ABC parcial en μm (Nayarit)	ABC parcial en μm (Veracruz)
A	297.43 a	218.58 b
T	259.52 a	347.32 ab
SA	247.88 a	373.80 a
4-FAA	273.07 a	237.93 ab

Cuadro 6. Evaluación de los tratamientos mediante el análisis de ABC en la variable índice de dilatación del tejido vascular.

Tratamiento	ABC parcial en μm (Nayarit)	ABC parcial en μm (Veracruz)
A	29.42 a	29.2 b
T	25.02 a	32.77 ab
SA	21.35 a	31.17 ab
4-FAA	30.27 a	39.52 a

Cuadro 7. Evaluación de los tratamientos mediante el análisis de ABC en la variable altura de callo.

Tratamiento	ABC parcial en μm (Nayarit)	ABC parcial en μm (Veracruz)
A	2930 b	7169 b
T	3773 b	7725 b
SA	1565 b	6864 b
4-FAA	13391 a	16463 a

Lo más relevante de este trabajo fue identificar que cada uno de los compuestos con los que se suplementó el medio MS para el cultivo *in vitro* de explantes de limón persa causaron diferentes efectos. Dentro de los cambios inducidos por estos compuestos, los más importantes fueron dilatación del tejido vascular, formación de callo, inducción de regiones meristemáticas y formación de brotes adventicios, principalmente ocasionados por 4-FAA, sulfato de adenina y adenina. Reportes con resultados parecidos a los nuestros han sido publicados en diferentes especies de cítricos; sin embargo, en ninguno de ellos se ha trabajado con limón persa o explantes provenientes de campo. A pesar de que en estos trabajos el genotipo y origen de los explantes es diferente, reportan que el origen de la dediferenciación es a partir de células de cambium originando divisiones periclinales que dan lugar a la formación de varias capas por encima de la superficie de corte, en donde se identificaron regiones meristemáticas y brotación adventicia alrededor de los 30 días después de establecimiento (García-Luis *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Tavano *et al.*, 2009).

Debido a lo anterior se acentúa la importancia del medio de cultivo, especialmente el efecto de las fitohormonas, precursores de fitohormonas o activadores de división celular en la respuesta del explante (manifestándose mediante alteraciones o modificaciones anatómicas). En este trabajo los compuestos tanto del tipo auxínico (4-FAA) como citocinínico (adenina y sulfato de adenina), tuvieron un papel más relevante en la formación de brotes adventicios.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- El uso de varetas provenientes de campo, no es un material viable para la inducción de organogénesis adventicia.
- La brotación adventicia en explantes de limón persa, se logró con el uso de precursores de citocininas (adenina y sulfato de adenina) en concentraciones de 80 a 100 mg L⁻¹ y fue mediante la vía de organogénesis indirecta.
- La respuesta morfogénica en segmentos internodales de limón persa, está influenciada por la procedencia del explante, tipo y concentración de fitohormona, así como por la orientación del explante en el medio de cultivo.
- Cambios celulares e histológicos fueron inducidos por los precursores de fitohormonas y activadores de la división celular desde los 10 DDE. Dichos cambios ocurrieron principalmente a nivel de la región del cambium. El 4-FAA y la adenina permitieron la formación de regiones meristemáticas y brotes adventicios, respectivamente.
- Se detectaron los diversos cambios morfológicos y brotes adventicios inducidos por diferentes tratamientos en segmentos nodales de limón persa (*Citrus latifolia*) provenientes de árboles adultos de campo.
- A los 20 días del establecimiento en el medio de cultivo las células han respondido a la presencia del inductor produciendo regiones

meristemáticas por lo que, a este tiempo procedería cambiar de medio de cultivo para inducir la brotación.

- Se identificaron cuatro variables involucradas directamente en la aparición de puntos meristemáticos; ancho relativo de floema, índice de dilatación de tejido vascular, altura de callo y formación de regiones meristemáticas.
- Éste trabajo es el primero en reportar el efecto de adenina, sulfato de adenina, triacontanol y ácido-4-fluorofenoxiacético en la respuesta morfogénica de segmentos internodales de limón persa (*Citrus latifolia*).
- Este es el primer reporte del uso de inductores de brotación inusuales; adenina, sulfato de adenina, tricontanol y 4-FAA para la morfogénesis e inducción de brotes adventicios en limón persa.

Recomendaciones

Se recomienda establecer las plantas madre en invernadero de los cuales se puedan tomar varetas como explantes para su posterior establecimiento *in vitro*, así como probar otros explantes (hojas y ápices). En caso de que se decida utilizar material de campo es necesario el uso de PPM en el medio de cultivo para evitar altos porcentajes de contaminación al momento del establecimiento.

Una vez establecido el protocolo de limón persa, se recomienda hacer ensayos de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* en el cual se use el gen de la capa proteica del CTV y péptidos antimicrobianos contra HLB, con la finalidad de crear especies resistentes a estas enfermedades.

CAPITULO VI. LITERATURA CITADA

- Agusti F. M. 2003. Citricultura. 2da edición. Mundi Prensa. Madrid, España 65-88 pp.
- Al-Bahrany A. M. 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae* 95: 285-295.
- Almeida W. A. B.; F. A. A. Mourão Filho; L. E. Pino; R. L. Boscariol; A. P. M. Rodríguez and B. M. J. Mendes. 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Science* 164: 203-211.
- Almeida W. A. B.; F. A. A. Mourão Filho; B. M. J. Mendes and A. P. M. Rodríguez. 2006. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum* 3: 321-325.
- Bantawa P.; O. S. Roy; P. Ghosh and T. K. Mondal. 2009. Effect of bavistin and adenine sulphate on *in vitro* shoot multiplication of *Picrorhiza scrophulariflora* Pennell. An endangered medicinal plant of Indo-China Himalayan regions. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 19: 237-245.
- Biasi L. A.; M. C. Falco; A. P. M. Rodríguez and B. M. Januzzi Mendes. 2000. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. *Scientia Agricola* 57: 661-665.
- Bordon Y.; J. L. Guardiola and A. García-Luis. 2000. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. *Annals of Botany* 86: 159-166.

- Burikam S.; V. Chommalee and S. Attathom. 1988. Effects of plant growth regulators on papaya (*Carica papaya*) cultured *in vitro*. National Scientific Supply 22: 1-6.
- Chávez-Vela N. A.; L. I. Chávez-Ortiz y E. Pérez-Molphe Balch. 2003. Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia* 37: 629-639.
- Chilton M. D.; M. H. Drummond; D. J. Merio; D. Sciaky; A. L. Montoya; M. P. Gordon and E. W. Nester. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271.
- Chugh A. and P. Khurana. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. *Current Science* 83: 715-730.
- Coenen C. and T. L. Lomax. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science Reviews* 2: 351-356.
- Costa M. G. C.; V. S. Alves; E. R. G. Lani; P. R. Mosquim; C. R. Carvalho and W. C. Otoni. 2004. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. *Scientia Horticulturae* 100: 63-74.
- Cruz D. S.; H. S. D. Urbina; V. I. Basurto y S. F. Montiel. 2003. Análisis de estacionalidad de la producción y precios en el mercado de productos hortofrutícolas y frijol. SAGARPA. México, D. F. 25-30 pp.
- Curti-Díaz S. A.; X. Loredó-Salazar; U. Díaz-Zorrilla; J. A. Sandoval R. y J. Hernández H. 2000. Tecnología para producir limón persa. INIFAP-

- CIRGOC. Campo Experimental Ixtacuaco. Libro Técnico Núm 8. Veracruz, México. 144 p.
- Curtis I. S. and T. E. Mirkov. 2012. Influence of surfactants on growth and regeneration from mature internodal stem segments of sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 345-352.
- Davey M. R. and P. Anthony. 2010. *Plant Cell Culture Essential Methods*. Wiley-Blackwell. Singapur. 358 pp.
- Domínguez A.; J. Guerri; M. Cambra; L. Navarro; P. Moreno and L. Peña. 2000. Efficient production of transgenic *Citrus* plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 19:427-433.
- D'Souza M. C. and M. Sharon. 2001. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 37:168-172.
- Duclercq J.; B. Sangwan-Norreel; M. Catterou and R. S. Sangwan. 2011. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Plant Science* 16: 597-606.
- Dutt M.; J. Madhavaraj and J. W. Grosser. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and plant regeneration from a complex tetraploid hybrid citrus rootstock. *Scientia Horticulturae* 123: 454-458.
- Duran-Vila N.; V. Ortega and L. Navarro. 1989. Morphogenesis and tissue culture of three citrus species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 16: 123-133.

- Esau K. 1982. Anatomía de plantas con semilla. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 512 p.
- Esquivel C. F. 2011. Análisis Histológico y epidemiológico del limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 56 pp.
- Esquivel-Chávez F.; G. Valdovinos-Ponce; G. Mora-Aguilera; R. Gómez Jaimes; J. J. Velázquez-Monreal; M. A. Manzanilla-Ramírez; J. L. Flores-Sánchez y J. I. López-Arroyo. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- FAOSTAT. Consultada el 02 de febrero de 2013. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Febres V. J.; C. L. Niblett; R. F. Lee and G. A. Moore. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradise* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Reports* 21: 421-428.
- Flores S. J. L. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB), en la península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 67 p.
- Fundecitrus. 2009. Manual técnico de Greening. Folleto técnico Julio. Brasil. 12 pp.
- García-Luis A.; Y. Bordon; J. M. Moreira-Dias; R. V. Molina and J. L. Guardiola. 1999. Explant orientation and polarity determine the

morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. *Annals of Botany* 84: 715-723.

García-Luis A.; R. V. Molina; V. Varona; S. Castelló and J L. Guardiola. 2006. The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 137-144.

Gaspar T.; C. Kevers; C. Penel; H. Greppin; D. M. Reid and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 32: 272-289.

Germaná M. A.; M. Micheli; B. Chiancone; L. Macaluso and A. Standardi. 2011. Organogenesis and encapsulation of *in vitro* derived propagules of Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 299-307.

Girihdar P.; E. P. Indu; G. A. Ravishankar and A. Chandrasekar. 2004. Influence of triacontanol on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. Ex. Fr. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 40: 200-203.

Grzegorzczuk I.; I. Bilichowski; E. Mikiciuk-Olasik and H. Wysokinska. 2006. The effect of triacontanol on shoot multiplication and production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Acta Societatis Botanicum Poloniae* 75: 11-15.

Hangarter R. and S. Ries. 1978. Effect of triacontanol on plant cell cultures *in vitro*. *Plant Physiology* 61: 855-857.

- Heo J. W.; K. Y. Paek; C. H. Kang and C. H. Chun. 2006. Internal air current patterns depend on the ventilation method in a scaled-up culture vessel for micropropagation. *Journal of Plant Biology* 49: 167–173.
- Herrera I. L. 2009. Sequence diversity on four ORFs of citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. *Virology Journal* 6:116.
- Ikeda M.; M. Umehara and H. Kamada. 2006. Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* 23: 153-161.
- Irey S.M; T. Gast and J. Snively. 2008. Grove management at Southern gardens citrus in the presence of Huanglongbing. In: *Memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp)*. Sonora, México. 1-5 pp.
- Jiménez V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
- Kamata Y.; N. Masamura; A. Miyazaki and T. Nagata. 2011. A novel autofluorescence-based selection of calli amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Biotechnology* 28: 361-371.
- Kaneyoshi J.; S. Kobayashi; Y. Nakamura; N. Shigemoto and Y. Doi. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange. *Plant Cell Reports* 13: 541-545.

- Kobayashi A. K.; J. C. Bespalhok; L. F. P. Pereira and L. G. E. Vieira. 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:99-102.
- Kotsias D. and P. A. Roussos. 2001. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. *Scientia Horticulturae* 89: 115-128.
- Kumar V.; L. Laouar; M. R. Davery; B. J. Mulligan and K. C. Lowe. 1992. Pluronic F-68 stimulates growth of *Solanum dulcamara* in culture. *Journal of Experimental Botany* 43: 487-492.
- Lee J; S. Seo; B. Kim; S. Woo; B. Koo; T. Park; Y. P. Lim and S. Kim. 2012. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the reed grass (*Phragmites communis* Trin.). *African Journal of Biotechnology* 11: 1904-1911.
- Lee R. F.; H. R. Papu; M. A. Rocha-Peña; V. J. Febres; K. L. Manjunah; O. V. Nicolaeva; A. V. Karasev; B. Cevik; M. Akbolut; D. Benscher; E. J. Anderson; M. Price; F. Ochoa and C. L. Niblett. 1996. Progress on strain differentiation of citrus tristeza virus. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14: 79-87.
- Leng C. T.; A. B. Haw and C. Lai-Keng. 2004. Effect of reduced N6-benzyladenine, explant type, explant orientation, culture temperature and culture vessel type on regeneration of adventitious shoot and *in vitro* plantlets of *Spilanthes acmella*. *Journal of Plant Biology* 47: 15-20.
- Litz, R. E. y R. L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivo de*

tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca W. M. y L. A. Mroginski (Eds). CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 970p.

Luo H. R.; M. Santa-Maria; J. Benavides; D. P. Zhang; Y. Z. Zhang and M. Ghislain. 2006. Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis. African Journal of Biotechnology 5: 1851-1857.

Maggon R. and B. D. Singh. 1995. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and Hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Scientia Horticulturae 63: 123-128.

Malabadi R. B.; G. S. Mulgund and K. Nataraja. 2005a. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tips sections. Journal of Plant Physiology 162: 473-478.

Malabadi R. B.; G. S. Mulgund and K. Nataraja. 2005b. Effect of triacontanol on the micropropagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. using rhizome thin sections. *In vitro* Cellular and Developmental Biology 41: 129-132.

Marques N. T.; G. B. Nolasco and J. P. Leitão. 2011. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. Scientia Horticulturae 129: 176-182.

Marutani-Hert M.; T. J. Evens; G. T. McCollum and R. P. Niedz. 2011. Bud emergence and shoot growth from mature citrus nodal stem segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106:81-91.

- Mitra G. C.; R. N. Prasad and R. A. Choudhury. 1976. Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed callus of orchid correlative changes in its free amino acid content. *Indian Journal of Experimental Biology* 14:350.
- Montoya H. L. M. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Medellin, Colombia. 77 p.
- Moore G. A.; C. C. Jacono; J. L. Neidigh; S. D. Lawrence and K. Cline. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11: 238-242.
- Mroginski L. A. y W. M. Roca. 1991 Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca W. M. y L. A. Mroginski (Eds). CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 970 p.
- Mukeshimana G.; Y. Ma; A. E. Walworth; G. Song and J. D. Kelly. 2012. Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Biotechnology Reports* 7: 59-70.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Naik S. K. and P. K. Chand. 2003. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot

- regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Journal of Plant Physiology* 160: 423-430.
- Nandagopal S. and B. D. Ranjitha Kumari. 2006. Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and *in vitro* flowering of *Cichorium intybus* L. cv. Focus – a potent medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 87: 415-425.
- Niedz R. P. and Bausher M. G. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field-grown trees. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 38: 468-471.
- Niedz P. P.; M. R. Sussman and J. S. Satterlee. 1995. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Reports* 14: 403-406.
- Niem K. M.; L. Kauppinen and Y. Helariutta. 2004. A weed for wood? *Arabidopsis* as a genetic model for xylem development. *Plant Physiology* 135: 653-659.
- Otani M. and T. Shimada. 1998. Embryogenic callus formation from immature embryo of japanese morning glory (*Pharbitis nil* Choisy). *Plant Biotechnology* 15: 127-129.
- Otani M.; T. Shimada; T. Kimura and A. Saito. 1998. Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batata* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology* 15: 11-16.
- Palacios T. E. C. 2007. Clonación y secuenciación de genes del CTV y su uso en transformación genética de cítricos. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 252 p.

- Parimalan R; P. Giridhar; H. B. Gururaj and G. A. Ravishankar. 2009. Micropropagation of *Bixa orellana* using phytohormones and triacontanol. *Biologia Plantarum* 53: 347-350.
- Peixoto de Oliveira M. L.; M. G. Cardoso Costa; C. Viana de Silva and W. Campos Otoni. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 654-660.
- Peña L.; R. M. Pérez; M. Cervera; J. A. Juárez and L. Navarro. 2004. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany* 94: 67-74.
- Pérez-Molphe E. M.; R. Ramírez-Malagón; H. G. Nuñez-Palenius y N. – Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 179 p.
- Pérez-Tornero O.; J. Egea; A. Vanoostende and L. Burgos. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science* 158: 61-70.
- Pérez-Tornero O.; C. I. Tallón and I. Porras. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 263-271.
- Quiroz-Velásquez J. D.; M. A. Peña del Río; M. A. Cruz Hernández; S. Fernández Dávila; M. González Paz and A. Mendoza Herrera. 2008. Genome sequence of a virus tristeza virus isolate. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31: 95-104.

- Radice S. 2004. Morfogénesis. En: Biotecnología y mejoramiento Vegetal II. Levitus G.; V. Echenique; C. Rubinstein; E. Hopp y L. Mroginski (Eds.). INTA. Colombia. 26-33 p.
- Raha S. and S. C. Roy. 2001. *In vitro* plant regeneration in *Holorrhena antidysenterica* wall through high frequency axillary shoot proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology –Plant* 37: 232-236.
- Ramesh M.; R. M. Saravanakumar and S. K. Pandian. 2005. Benzyl amino purine and adenine sulphate induced multiple shoot and root induction from nodal explants of Brahmi, *Bacopa monnieri* (Linn.) Penn. *Natural Product Radiance* 5: 44-51.
- Rangel-Fajardo M. A.; H. A. Zavaleta-Mancera; L. Córdova-Téllez; A. P. López-Andrade; A. Delgado-Alvarado; I. Vidales-Fernández y A. Villegas-Monter. 2012. Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo mexicano. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 189-197.
- Raven P. H.; R. F. Evert y S. E. Eichhorn. 1992. *Biología de las plantas*. Editorial Reverté. España. 402 p.
- Ries S. K. and V. F. Wert. 1988. Rapid elicitation of second messengers by nanomolar doses of triacontanol and octacosanol. *Planta* 173: 79-87.
- Ries, S. K. 1985. Regulation of plant growth with triacontanol *Critical Reviews in Plant Sciences* 2: 239-285

- Ries S. K.; V. F. Wert; C. C. Sweeley and R. A. Leavitt. 1977. Triacontanol: a new naturally occurring plant growth regulator. *Science* 195: 1339-1341.
- Robles G. M. M. 2006. Capacidad de *Agrobacterium rhizogenes* para la transformación genética de tejidos maduros de cítricos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Colima. Colima, Col. México. 159 p.
- Rocha-Peña M. A.; R. F. Lee; R. Lastra; C. L. Niblett; F. M. Ochoa-Corona; S. M. Garnsey and R. K. Yokomi. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79: 437-445.
- Rodríguez A.; M. Cervera; E. J. Peris and L. Peña. 2008. The same treatment for transgenic shoot regeneration elicits the opposite effect in mature explants from two closely related sweet orange (*Citrus sinensis* L.) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 97-106.
- SENASICA. Consultado el 16 de mayo de 2012. <http://www.senasica.gob.mx/?id=4513>.
- Shrivastava S. and M. Banerjee. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *International Journal of Integrative Biology* 3: 73-79.
- SIAP. Consultado el 06 de abril de 2012. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350.

- Skoog F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plants tissue cultured *in vitro*. Symposia Society for Experimental Biology 54: 118-130.
- Sridhar T. M. and C. V. Naidu. 2011. Antimicrobial agents alters the *in vitro* plant regeneration in *Solanum nigrum* (L.). Journal of Plant Tissue Culture 3: 65-68.
- Strasburger E.; P. Sitte; E.W. Welier; J.W. Kadereit; A. Bresinsky and C. Körner. 2004. Tratado de Botánica. 35^a Edición. Ediciones OMEGA. 1152 p.
- Sujana P. and C. V. Naidu. 2011. Influence of bavistin, cefotaxime, kanamycin and silver thiosulphate on plant regeneration of *Mentha piperita* (L.) – an important multipurpose medicinal plant. Journal of Phytology Tissue Culture 3: 36-40.
- Taiz L and E. Zeiger. 2006. Ethylene: The Gaseous Hormone. In: Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. Pp. 567-586.
- Tallón C. I.; I. Porrás and O. Pérez-Tornero. 2012. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 48: 488-499.
- Tanikawa T.; M. Takagi and M. Ichii. 1996. Plant regeneration from suspension cultures of onion (*Allium cepa* L.). Plant Tissue Culture Letters 13: 259-264.

- Tanikawa T.; M. Takagi and M. Ichii. 1998. Varietal differences in plant regeneration from solid and suspension cultures in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Tissue Culture Letters* 67: 856-861.
- Tantos A.; A. Mészáros; J. Kissimon; G. Horváth and T. Farkas. 1999. The effect of triacontanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. *Plant Cell Reports* 19: 88-91.
- Tantos A.; A. Mészáros; T. Farkas; J. Szalai and G. Horváth. 2001. Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Reports* 20: 16-21.
- Tavano E. C. R.; L. C. L. Stipp; F. R. Muniz; F. A. A. Mourão Filho and B. M. J. Mendes. 2009. *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biologia Plantarum* 53: 395-399.
- Tisserat B. and S. F. Vaughn. 2008. Growth, morphogenesis and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 44: 40-50.
- Tiwari V.; K. N. Tiwari and B. D. Singh. 2006. Shoot bud regeneration from different explants of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. by trimethoprim and bavistin. *Plant Cell Reports* 25: 629-635.
- Tzfira T., and V. Citovsky. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Plant Biotechnology* 17: 147-154.
- Valderrama-Fonseca A. M.; R. Arango-Isaza y L. Afanador Kafuri. 2005. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, ingeniería genética natural aplicada. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 58: 2569-2585.

- Vardi A.; S. Bleichman and D. Aviv. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplast and regeneration of transgenic plants. *Plant Science* 69: 199-206.
- Verma A.; C. P. Malik; V. K. Gupta and B. K. Bajaj. 2011. Effects of *in vitro* triacontanol growth antioxidant enzymes, and photosynthetic characteristics in *Arachis hypogaea* L. *Brazilian Society of Plant Physiology* 23: 271-277.
- von Arnold S.; I. Sabala; P. Bozhkov; J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- Yancheva S. D.; S. Golubowicz; E. Fisher; S. Lev-Yadun and M. A. Flaishman. 2003. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Science* 165: 299-309.
- Yao J. L.; J. H. Wu; A. P. Gleave and B. A. M. Morris. 1996. Transformation of *Citrus* embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Science Limerick* 113: 175-183.
- Zhou Y.; C. Zhou.; Z. Song.; K. Liu. and F. Yang. 2007. Characterization of citrus tristeza virus isolates by indicators and molecular biology methods. *Agricultural Sciences* 6: 573-579.

CAPÍTULO VII. ANEXOS
ANEXO I. SUBSTANCIAS EMPLEADAS

NOMBRE	FORMULA	PESO MOLECULAR	MARCA
Cloruro de calcio	CaCl ₂	111	SIGMA
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	CALEDON
Nitrato de potasio	KNO ₃	101.1	SIGMA
Yoduro de potasio	KI	166	SIGMA
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.9	SIGMA
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	136.1	SIGMA
Acido bórico	H ₃ BO ₃	61.83	MERCK
Molibdato de sodio hidratado	Na ₂ Mo ₂ ·H ₂ O	241.95	ANALIT
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	FERMONT
Sulfato de manganeso hidratado	MnSO ₄ ·H ₂ O	169.02	MERCK
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.7	SIGMA
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	MERCK
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.028	J.T.Baker
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (NaEDTA)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	372.24	SIGMA
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	MERCK
Piridoxina hidrociorada	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	205.6	SIGMA
Tiamina hidrociorada	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	337.27	MERCK
Acido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	SIGMA
Myo inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	SIGMA
Pantotenato de calcio	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	476.53	SIGMA

Acido indolacético (AIA)	$C_{10}H_9NO_2$	175.2	SIGMA
Acido naftalenacético (ANA)	$C_{12}H_{10}O_2$	186.2	SIGMA
Bencil aminopurina (BAP)	$C_{12}H_{11}N_5$	225.3	<i>Phyto</i> Technology Laboratories
Triacontanol	$C_{30}H_{62}O$	438.81	SIGMA
Acido-4-fluorofenoxiacético (4-faa)	$C_8H_7FO_3$	170.14	SIGMA
Adenine	$C_5H_5N_5$	135.13	SIGMA
Sulfato de adenine	$(C_5H_5N_5)_2$ H_2SO_4	368.34	SIGMA
Acido giberélico (ag ₃)	$C_{19}H_{22}O_6$	346.38	SIGMA
Nitrato de plata	$AgNO_3$	169.9	SIGMA
Sacarosa			REFINADA (comercial)
Agar-agar			MERCK
Ppm (preservative for plant tissue culture media)			PLANT CELL TECHNOLOGY

**ANEXO II. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIANTE PRUEBA DE “T”
PARA TODAS LAS VARIABLES EVALUADAS**

EXPERIMENTO NAYARIT-MARZO.

Todas las pruebas fueron comparando cada uno de los tratamientos (A= adenina, T= triacantanol, SA= sulfato de adenina y FAA= ácido-4-fluorofenoxiacético) en los diferentes días de evaluación (10, 20 y 30 DDE) contra el testigo (TES), en variables donde no había respuesta por parte del testigo como en altura de callo y regiones meristemáticas, se compararon entre tratamientos.

Ancho relativo de corteza

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04244602	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01404927	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07302335	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.09300867	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04974525	

Diámetro relativo de células de corteza

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06119916	

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02141513	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03821877	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01509001	

	A20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06400219	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03898336	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05426052	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01839391	

Ancho relativo de corteza (corte longitudinal)

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04858396	

Ancho relativo de floema

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01749692	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01635073	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05646929	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01255619	

Índice de dilatación de tejido vascular

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05924817	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01681118	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00991614	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01262971	

	FAA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01797502	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01119237	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02154777	

Ancho relativo de xilema intervascular

	T 20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.09220039	

Ancho relativo de xilema vascular

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03462382	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.09967343	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05220513	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0356361	

Diámetro relativo de células de xilema

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03882721	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05097846	

	A20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02820243	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.09802588	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.08249855	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04497248	

Número relativo de células en xilema vascular

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0542843	

Diámetro de células de médula

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04566733	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03407508	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.08700212	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.08660805	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02730782	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07338335	

Altura de callo

	faa20	a20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0858032	

	faa20	sa20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0576586	

	t20	sa20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0719464	

	a20	sa20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07601327	

	faa30	a30
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00437387	

	faa30	sa30
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02702724	

	faa30	t30
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00598329	

Regiones meristemáticas

	FAA 30	FAA 20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01276541	

VERACRUZ-ABRIL

Ancho relativo de corteza

Sin diferencias significativas

Diámetro relativo de células de corteza

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01564571	

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00581903	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00080593	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00939139	

	sa20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02804389	

	FAA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06036336	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02092785	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0258398	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06868125	

Ancho relativo de corteza (corte longitudinal)

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06437667	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06075381	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07740695	

Ancho relativo de floema

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00198871	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05718454	

Índice de dilatación de tejido vascular

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00645853	

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03595362	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00507863	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07890417	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00162881	

	SA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07195694	

	FAA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07919517	

	A30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02935792	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02264884	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06881291	

Ancho relativo de xilema intervascular

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03550929	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0205965	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06021873	

	FAA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01217272	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01506644	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03570713	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05720816	

Ancho relativo de xilema vascular

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.08905418	

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02674279	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03845413	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04430109	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05829604	

	FAA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02170064	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02429574	

	SA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03023255	

	FAA30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01362276	

Diámetro relativo de células de xilema

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01050798	

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0371185	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.02630208	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03582768	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.037574	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07671682	

Número relativo de células de xilema vascular

	A20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04205638	

	T20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04607829	

	FAA20	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01231781	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.09018372	

Diámetro relativo de células de médula

	A10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0901779	

	T10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.04955493	

	SA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.03867066	

	FAA10	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07311506	

	T30	TES
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0714905	

Altura de callo

	faa10	sa10
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0972881	

	faa10	a10
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.06632201	

	faa20	t20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.05174341	

	faa20	sa20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01877248	

	faa20	a20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0042594	

	faa30	a30
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.0549058	

	faa30	t30
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.01783641	

	faa30	sa30
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.00107019	

Regiones meristemáticas

	FAA30	FAA20
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
P(T<=t) dos colas	0.07034881	

ANEXO III. PRUEBA DE TUKEY EN SAS PARA TODAS LAS VARIABLES

```
/* Analisis de varianza del efecto de precursores de hormonas */
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
data evaluacion diferentes variables;
/* exp= experimento; trat= tratamiento; rep= repeticiones*/
/* arxi= ancho relativo de xilema intervascular*/
/* arc= ancho relativo de corteza*/
/* arf= ancho relativo de floema*/
/* drcx= diámetro relativo de células de xilema*/
/* drcc= diámetro relativo de células de corteza*/
/* drcm= diámetro relativo de células de médula*/
/* todos los datos estan tratados para reducir la variabilidad*/
/* al eliminar valores maximos y minimos y dividirlos entre el*/
/* % diámetro del explante*/
input exp fecha trat$ rep arxi arc arf drcx drcc drcm;
/*el test (testigo) se colocó en cada una de las fechas evaluadas*/
/*por experimento con la finalidad de poder comparar cada fecha*/
/*con el testigo, haciendo que SAS lo reconozca como un tratamiento*/
/*a comparar*/
cards;
... (datos obtenidos de los experimentos)
;
proc print;
/*proc sort es con la finalidad de ordenar las observaciones*/
/*en este caso respecto a experimento y fecha*/
proc sort; by exp fecha;
/*proc glm es una instrucción parecida al proc anova*/
/*solo que ésta se utiliza cuando el diseño está desbalanceado*/
/*con la instrucción by seguida del GLM, le pedimos que proporcione*/
/*resultado por experimento y fecha*/
/* GLM CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR*/
proc glm; by exp fecha;
class trat;
model arxi arc arf drcx drcc drcm = trat;
means trat/tukey;
title 'análisis de varianza completam al azar';
run;
```

```

/* Analisis de varianza del efecto de precursores de hormonas */
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
data evaluacion diferentes variables;
/* exp= experimento; trat= tratamiento; rep= repeticiones*/
/* idtv= dilatación de tejido vascular*/
/* arcl= ancho relativo de corteza, corte longitudinal*/
/* arxv= ancho relativo de xilema vascular*/
/* nrcxv= número relativo de células de xilema vascular*/
/* caso todos los datos estan tratados para atribuir efecto al
tratamiento*/
/* y no al tamaño inicial del explante, además de reducir variabilidad*/
/* en dato al eliminar valores maximos y minimos y dividirlos entre el*/
/* ¼ diámetro del explante, excepto idtv dado que esta respuesta*/
/* es por efecto del tratamiento y no por el tamaño inicial del
explante*/
input exp fecha trat$ rep idtv arcl arxv nrcxv;
/*el test (testigo) se colocó en cada una de las fechas evaluadas*/
/*por experimento con la finalidad de poder comparar cada fecha*/
/*con el testigo, haciendo que SAS lo reconozca como un tratamieto*/
/*a comparar*/
cards;
... (aquí van los datos obtenidos de los experimentos)
;
proc print;
/*proc sort es con la finalidad de ordenar las observaciones*/
/*en este caso respecto a experimento y fecha*/
proc sort; by exp fecha;
/*proc glm es una instrucción parecida al proc anova*/
/*solo que ésta se utiliza cuando el diseño está desbalanceado*/
/*con la instrucción by seguida del GLM, le pedimos que proporcione*/
/*resultado por experimento y fecha*/
/* GLM CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR*/
proc glm; by exp fecha;
class trat;
model idtv arcl arxv nrcxv = trat;
means trat/tukey;
title 'analisis de varianza completam al azar';
run;

```



```

/* Analisis de varianza del efecto de precursores de hormonas */
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
data evaluacion diferentes variables;
/* exp= experimento; trat= tratamiento; rep= repeticiones*/
/* rm= regiones meristemáticas*/
/* AlCa= altura de callo*/
/* estas variables no se modificaron con respecto al tamaño inicial del
explante*/
/* dado que esta respuesta es atribuida al efecto del tratamiento*/
/* y no por el tamaño inicial del explante, el testigo no se encuentra, ya
que*/
/* no hubo variable a evaluar*/
input exp fecha trat$ rep rm AlCa;
/*el test (testigo) se colocó en cada una de las fechas evaluadas*/
/*por experimento con la finalidad de poder comparar cada fecha*/
/*con el testigo, haciendo que SAS lo reconozca como un tratamieto*/
/*a comparar*/
cards;
. . . (aquí van los datos obtenidos de los experimentos)
;
proc print;
/*proc sort es con la finalidad de ordenar las observaciones*/
/*en este caso respecto a experimento y fecha*/
proc sort; by exp fecha;
/*proc glm es una instrucción parecida al proc anova*/
/*solo que ésta se utiliza cuando el diseño está desbalanceado*/
/*con la instrucción by seguida del GLM, le pedimos que proporcione*/
/*resultado por experimento y fecha*/
/* GLM CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR*/
proc glm; by exp fecha;
class trat;
model rm AlCa = trat;
means trat/tukey;
title 'análisis de varianza completam al azar';
run;

```

ANEXO IV. PRUEBA DE ÁREA BAJO LA CURVA PARA LAS VARIABLES ANCHO DE FLOEMA, ÍNDICE DE DILATACIÓN DE TEJIDO VASCULAR Y ALTURA DE CALLO

EXPERIMENTO NAYARI-MARZO

```
/* Analisis de Área bajo la curva del efecto de precursores de hormonas
*/
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
DATA ABCPE;
input Exp fecha trat $ rep af;
y= af;
cards;
... (datos)
;
proc print;
RUN;
PROC SORT; BY trat rep;
PROC PLOT; BY trat;
PLOT y*fecha;
TITLE "PLOT de epidemias por tratamiento";
/* calculo de ABC */
DATA abc; SET ABCPE;
SEGAREA=((y+LAG (y))/2)*(fecha-LAG(fecha));
IF fecha=10 THEN SEGAREA=.;
PROC PRINT;
TITLE "Area Parcial de la variable af";
/*instrucción necesaria para ABC por repeticiones*/
proc sort; by trat rep;
PROC SUMMARY DATA= abc NWAY;
CLASS trat rep;
VAR SEGAREA y;
OUTPUT OUT=TOTAREA SUM (SEGAREA)=ABCP MIN (y) =Y0 MAX (y) =Yf;
PROC PRINT;
TITLE "Area Absoluta ABCPE de la variable af";
RUN;
/* para hacer comparación de medias con los datos del*/
/* cálculo del ABCP*/
Proc anova;
class trat;
model yf ABCP=trat;
means trat/tukey;
run;
```

```

/* Analisis de Área bajo la curva del efecto de precursores de hormonas
*/
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
DATA ABCPE;
input Exp fecha trat $ rep alca;
y= alca;
cards;
... datos
;
proc print;
RUN;
PROC SORT; BY trat rep;
PROC PLOT; BY trat;
PLOT y*fecha;
TITLE "PLOT de epidemias por tratamiento";
/* calculo de ABC */
DATA abc; SET ABCPE;
SEGAREA=((y+LAG (y))/2)*(fecha-LAG(fecha));
IF fecha=10 THEN SEGAREA=.;
PROC PRINT;
TITLE "Area Parcial de la variable alca";
/*instrucción necesaria para ABC por repeticiones*/
proc sort; by trat rep;
PROC SUMMARY DATA= abc NWAY;
CLASS trat rep;
VAR SEGAREA y;
OUTPUT OUT=TOTAREA SUM (SEGAREA)=ABCP MIN (y) =Y0 MAX (y) =Yf;
PROC PRINT;
TITLE "Area Absoluta ABCPE de la variable alca";
RUN;
/* para hacer comparación de medias con los datos del*/
/* cálculo del ABCP*/
Proc anova;
class trat;
model yf ABCP=trat;
means trat/tukey;
run;

```

```

/* Analisis de Área bajo la curva del efecto de precursores de hormonas
*/
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
DATA ABCPE;
input Exp fecha trat $ rep idtv;
y= idtv;
cards;
... datos
;
proc print;
RUN;
PROC SORT; BY trat rep;
PROC PLOT; BY trat;
PLOT y*fecha;
TITLE "PLOT de epidemias por tratamiento";
/* calculo de ABC */
DATA abc; SET ABCPE;
SEGAREA=((y+LAG (y))/2)*(fecha-LAG(fecha));
IF fecha=10 THEN SEGAREA=.;
PROC PRINT;
TITLE "Area Parcial de la variable idtv";
/*instrucción necesaria para ABC por repeticiones*/
proc sort; by trat rep;
PROC SUMMARY DATA= abc NWAY;
CLASS trat rep;
VAR SEGAREA y;
OUTPUT OUT=TOTAREA SUM (SEGAREA)=ABCP MIN (y) =Y0 MAX (y) =Yf;
PROC PRINT;
TITLE "Area Absoluta ABCPE de la variable idtv";
RUN;
/* para hacer comparación de medias con los datos del*/
/* cálculo del ABCP*/
Proc anova;
class trat;
model yf ABCP=trat;
means trat/tukey;
run;

```

VERACRUZ-ABRIL

```
/* Analisis de Área bajo la curva del efecto de precursores de hormonas
*/
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
DATA ABCPE;
input Exp fecha trat $ rep af;
y= af;
cards;
... datos
;
proc print;
RUN;
PROC SORT; BY trat rep;
PROC PLOT; BY trat;
PLOT y*fecha;
TITLE "PLOT de epidemias por tratamiento";
/* calculo de ABC */
DATA abc; SET ABCPE;
SEGAREA=((y+LAG (y))/2)*(fecha-LAG(fecha));
IF fecha=10 THEN SEGAREA=.;
PROC PRINT;
TITLE "Area Parcial de la variable af";
/*instrucción necesaria para ABC por repeticiones*/
proc sort; by trat rep;
PROC SUMMARY DATA= abc NWAY;
CLASS trat rep;
VAR SEGAREA y;
OUTPUT OUT=TOTAREA SUM (SEGAREA)=ABCP MIN (y) =Y0 MAX (y) =Yf;
PROC PRINT;
TITLE "Area Absoluta ABCPE de la variable af";
RUN;
/* para hacer comparación de medias con los datos del*/
/* cálculo del ABCP*/
Proc anova;
class trat;
model yf ABCP=trat;
means trat/tukey;
run;
```

```

/* Analisis de Área bajo la curva del efecto de precursores de hormonas
*/
/* en explantes internodales de limón persa provenientes de campo */
/* Realizado por: Adriana Isabel Pérez Luna en el 2012 */
/* Tesis de Maestria Colegio de Postgraduados Montecillo */
DATA ABC;
input Exp fecha trat $ rep idtv;
y= idtv;
cards;
... datos
;
proc print;
RUN;
PROC SORT; BY trat rep;
PROC PLOT; BY trat;
PLOT y*fecha;
TITLE "PLOT de epidemias por tratamiento";
/* calculo de ABC */
DATA abc; SET ABCPE;
SEGAREA=((y+LAG (y))/2)*(fecha-LAG(fecha));
IF fecha=10 THEN SEGAREA=.;
PROC PRINT;
TITLE "Area Parcial de la variable idtv";
/*instrucción necesaria para ABC por repeticiones*/
proc sort; by trat rep;
PROC SUMMARY DATA= abc NWAY;
CLASS trat rep;
VAR SEGAREA y;
OUTPUT OUT=TOTAREA SUM (SEGAREA)=ABCP MIN (y) =Y0 MAX (y) =Yf;
PROC PRINT;
TITLE "Area Absoluta ABCPE de la variable idtv";
RUN;
/* para hacer comparación de medias con los datos del*/
/* cálculo del ABCP*/
Proc anova;
class trat;
model yf ABCP=trat;
means trat/tukey;
run;

```