

22
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PROLIFERACION
IN VITRO DEL LIMON MEXICANO
CITRUS AURANTIFOLIA (CHRISM.) SWING.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
OCTAVIO REYES LOPEZ

Director de Tesis :
M. C. ANGEL VILLEGAS MONTER



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
Lista de Cuadros	VII
Lista de Gráficas	IX
Lista de Figuras	X
RESUMEN	XI
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
1. Factores Intrínsecos al Medio de Cultivo	3
2. Condiciones Ambientales del Cultivo	5
2.1. Luminosidad	5
2.2. Temperatura	7
2.3. Sustrato del Cultivo	8
3. Factores a Considerar en la proliferación	9
3.1. Efecto de la Luz	9
3.2. Citocininas	11
4. Factores que influyen en el Enraizamiento	14
4.1. Efecto de la Oscuridad	15
4.2. Efecto de la Intensidad de Luz	16
4.3. Auxinas	19
5. Conclusiones sobre la Revisión de Literatura.	23
MATERIALES Y METODOS.	26
1. Localización	26
2. Medio de Cultivo	26
3. Proliferación	27

	Página
3.1. Implantación Inicial	27
3.2. Primera Transferencia	29
3.3. Segunda Transferencia	29
3.4. Tercera Transferencia	29
4. Enraizamiento	30
4.1. Primer Ensayo	30
4.2. Segundo Ensayo	30
4.3. Tercer Ensayo	31
4.4. Esquema Final de Enraizamiento	31
4.4.1. Primera Fase	32
4.4.2. Segunda Fase	32
5. Plante del Material Vegetativo	34
6. Condiciones de Incubación	34
7. Material y equipo de Laboratorio	35
7.1. Materiales	35
7.2. Equipo	35
8. Fechas de Implantación y Transferencia	36
9. Diseño Experimental	37
9.1. Proliferación	37
9.1.1. Implantación Inicial	37
9.1.2. Primera y Segunda Transferencia	38
9.1.3. Tercera Transferencia	38
9.2. Enraizamiento	39
9.2.1. Primer Ensayo	39
9.2.2. Segundo Ensayo	40

	Página
9.2.3. Tercer Ensayo	41
9.2.4. Esquema Final.	41
10. Toma de Datos	43
10.1. Proliferación	44
10.2. Enraizamiento	44
10.3. Contaminación	45
11. Análisis de Datos	45
RESULTADOS	46
1. Proliferación	46
1.1. Efecto de la Concentración del Medio	46
1.2. Efecto de la Concentración de Citocininas	53
1.3. Contaminación	61
2. Enraizamiento	63
2.1. Efecto del tipo y Concentración de Auxinas	63
2.2. Efecto de Diferentes condiciones de incubación	66
2.3. Contaminación	74
DISCUSION	76
1. Proliferación	76
2. Enraizamiento	78
CONCLUSIONES	81
APENDICE	82
LITERATURA REVISADA	90

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Tratamientos considerados para la implantación de Limón Mexicano al iniciar formalmente el experimento	28
2. Tratamientos correspondientes al segundo ensayo de enraizamiento.	31
3. Tratamientos establecidos en el esquema final de enraizamiento en su primera y segunda fase con relación a las - semanas de permanencia en el medio y bajo cuatro diferentes condiciones de luz.	33
4. Comparación de Medias para la variable número de brotes obtenidos en Promedio de acuerdo a su tamaño dependiendo de la concentración de las sales minerales del medio.	47
5. Comparación de Medias para la variable número de brotes obtenidos en promedio de acuerdo a su tamaño dependiendo de la concentración de las sales minerales del medio (para la primera y segunda transferencia)	49
6. Comparación de Medias para la variable longitud mayor de brotes obtenidos dependiendo de la concentración de las sales minerales del medio en la primera y segunda transferencia.	52
7. Comparación de Medias para la variable número de brotes, de acuerdo a su tamaño, dependiendo de la concentración de Citocininas (implantación).	53
8. Comparación de Medias para la variable número de brotes obtenidos en promedio de acuerdo a su tamaño dependiendo de la concentración de Citocininas (para la primera y segunda transferencia).	55
9. Comparación de Medias para la variable número de brotes dependiendo de una concentración de Citocininas (tercera transferencia).	58
10. Comparación de Medias para la variable longitud mayor de brotes obtenidos dependiendo de la concentración de Citocininas en la primera y segunda transferencia.	59
11. Evaluación de la contaminación en las etapas de proliferación considerando el número de tubos empleados, los - contaminados y el porcentaje de asepsia.	61

12. Evaluación porcentual de las auxinas ANA y AIB, en dos concentraciones, sobre las categorías de enraizamiento. Datos correspondientes al segundo y tercer ensayo. 64
13. Análisis porcentual de dos diferentes condiciones de incubación sobre las categorías de enraizamiento. Datos correspondientes al primer ensayo. 66
14. Evaluación en base a un análisis porcentual de dos condiciones de incubación sobre las categorías de enraizamiento. Datos correspondientes al segundo ensayo. 68
15. Análisis Porcentual de los efectos producidos sobre las variables de enraizamiento de plantas sometidas a tres condiciones de luz y después de ocho semanas, Datos correspondientes a la primera fase. 71
16. Interacción existente entre los medios que contenían tres concentraciones auxínicas (ANA) y el efecto al ser transferidas a un medio libre de reguladores sobre la variable número de plantas con raíces ya desarrolladas. 72
17. Análisis de Varianza de los efectos producidos sobre las variables de enraizamiento de plantas procedentes de medios con diferentes concentraciones auxínicas y después de ocho semanas. Datos correspondientes a la segunda fase. 73
18. Evaluación de la concentración en las etapas de enraizamiento considerando el número de tubos empleados, los contaminados y el porcentaje de asepsia. 74

LISTA DE GRAFICAS

	Página
1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LAS SALES DEL MEDIO SOBRE EL NUMERO DE BROTES PROMEDIO OBTENIDOS DE LIMON MEXICANO <u>IN VITRO</u> DE ACUERDO AL TAMAÑO.	48
2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO SOBRE EL NUMERO DE BROTES OBTENIDOS EN LA PRIMERA Y SEGUNDA TRANSFERENCIA, ORDENADOS DE ACUERDO A SU TAMAÑO.	50
3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA LONGITUD MAYOR DE BROTES OBTENIDOS EN LA PRIMERA Y SEGUNDA TRANSFERENCIA.	51
4. EFECTOS DE LA CONCENTRACION DE CITOCININAS SOBRE EL NUMERO DE BROTES PROMEDIO OBTENIDOS DE LIMON MEXICANO <u>IN VITRO</u> DE ACUERDO AL TAMAÑO.	54
5. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CITOCININAS SOBRE EL NUMERO DE BROTES OBTENIDOS EN LA PRIMERA Y SEGUNDA TRANSFERENCIA, ORDENADOS DE ACUERDO A SU TAMAÑO.	56
6. EFECTO DE UNA CONCENTRACION MAYOR DE CITOCININAS SOBRE EL NUMERO DE BROTES OBTENIDOS DE LIMON MEXICANO <u>IN VITRO</u> (TERCERA TRANSFERENCIA).	57
7. EFECTO DE UNA CONCENTRACION DE CITOCININAS SOBRE LA LONGITUD MAYOR DE BROTES OBTENIDOS EN LA PRIMERA Y SEGUNDA TRANSFERENCIA.	60
8. PORCENTAJE DE CULTIVOS ASEPTICOS Y CONTAMINADOS PARA LA PARTE DE PROLIFERACION EN SUS ETAPAS DE IMPLANTACION Y TRANSFERENCIA.	62
9. EVALUACIONES PORCENTUAL DE LAS AUXINAS ANA Y AIB EN 2 CONCENTRACIONES, SOBRE LAS CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO. DATOS CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO Y TERCER ENSAYO.	65
10. ANALISIS PORCENTUAL DE DOS DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LAS CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO. DATOS CORRESPONDIENTES AL PRIMER ENSAYO.	67
11. ANALISIS PORCENTUAL RESPECTO AL COMPORTAMIENTO DE DOS CONCENTRACIONES AUXINICAS Y 2 CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LAS CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO.	69
12. PORCENTAJE DE CULTIVOS ASEPTICOS Y CONTAMINADOS PARA LA PARTE DE ENRAIZAMIENTO EN SUS ENSAYOS Y EL ESQUEMA FINAL.	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
1.- ESQUEMA DE CALENDARIZACION PARA PROLIFERACION POR SEMANAS DE OBSERVACIONES PERMANENCIA EN EL MEDIO Y FECHAS DE IMPLANTACION Y TRANSFERENCIA.	86
2. ESQUEMA DE CALENDARIZACION PARA ENRAIZAMIENTO POR SEMANAS DE OBSERVACION, PERMANENCIA EN EL MEDIO Y FECHAS DE CADA UNO DE LOS ENSAYOS, ASI COMO EL ESQUEMA FINAL EN SUS DOS FASES.	87
3. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA LA PARTE DE PROLIFERACION JUNTO CON UN ESQUEMA GENERAL DE LA INVESTIGACION.	88
4. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA ENRAIZAMIENTO.	89

A P E N D I C E

1.A. SOLUCIONES CONCENTRADAS DE LAS SALES INORGANICAS DEL MEDIO MODIFICADO DE MURASHIGUE Y SKOOG (1962).	83
2.A. SIGNIFICANCIA DE LAS PRUEBAS DE "F" PARA CADA VARIABLE DE ESTUDIO EN LA PRIMERA FASE DEL ESQUEMA FINAL DE ENRAIZAMIENTO.	84
3.A. SIGNIFICANCIA DE LAS PRUEBAS "F" PARA CADA VARIABLE DE ESTUDIO EN LA SEGUNDA FASE DEL ESQUEMA FINAL DE ENRAIZAMIENTO.	85

R E S U M E N

El experimento se condujo en dos partes, en la primera se trabajó en proliferación, en donde se observó el efecto de la dilución de las sales minerales y la concentración de bencilamino purina (BA); mientras que en la segunda etapa se varió la concentración de auxinas en combinación con diferentes condiciones de iluminación para examinar el efecto que producen en la emisión y desarrollo de raíces de plantas cultivadas IN VITRO.

El diseño experimental empleado fue de parcelas divididas, en donde se utilizaron 2, 3 ó 4 repeticiones y con 5 tubos de ensaye que constituyeron la unidad experimental.

Se emplearon apices vegetativos de yemas axilares de Limón Mexicano que fueron establecidos previamente a las condiciones IN VITRO; el experimento dio inicio con el establecimiento de los brotes, para su observación posterior durante cuatro semanas para evaluar su grado de desarrollo y proliferación; posteriormente se hicieron transferencias cada cuatro semanas utilizando nuevos medios de cultivo y en diferentes concentraciones de BA para encontrar las dosis más adecuadas. En el enraizamiento se hicieron tres ensayos preliminares, de donde se planteó el esquema final, permaneciendo cuatro semanas en ese medio y después fueron transferidas a un medio sin auxinas, en (forma) donde se variaron las condiciones de luminosidad.

Para los experimentos se utilizó como medio de cultivo las sales minerales modificadas del medio de Murashigue y Skoog (1962), al 100%

75%, 50% y 25% de su concentración, complementando con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de Mioinositol, 30 g/l de sacarosa 5 g/l de Agar, ajustando el PH a 5.5., y como reguladores de crecimiento se utilizaron -- 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/l de BA para proliferación; en el caso de enraizamiento 0.5, 1.0, 0.93, 1.8 y 2.7 mg/l de Acido Naftalen-acético (ANA) y 0.5 y 1.0 mg/l el Acido Indolbutirico (AIB).

La metodología empleada para proliferación y enraizamiento resultó ser adecuada para evitar contaminación en los tubos ya que en todos los casos el porcentaje de asepsia fue superior al 98%.

Las condiciones para lograr los mejores efectos en proliferación fueron: una concentración de 75% en el establecimiento y un tiempo de permanencia de cuatro semanas máximo, así como una concentración de -- 0.8 mg/l de BA para obtener un mejor número de brotes y una mayor longitud de éstos, mientras que, para enraizamiento, los mejores resultados fueron al utilizar ANA en concentraciones de $5\mu\text{M}$ (2.793 mg/l) y permanecer por espacio de dos semanas en un medio auxinico y dos mas en un medio libre de éstas, primeramente en obscuridad completa (24 hrs) y las dos semanas restantes con un fotoperiodo de 16 hrs. bajo luz blanca; de esta forma se favorece el enraizamiento IN VITRO de plantulas de Citrus Aurantifolia.

INTRODUCCION

México actualmente ocupa el sexto lugar como productor de cítricos a nivel mundial y el primer lugar como productor de limón Mexicano. En el país los cítricos abarcan el 30% de la superficie cultivada con frutales, es decir que existen 226,000 hectáreas plantadas con cítricos en donde se obtiene una producción de 2.48 millones de toneladas con un valor estimado de la producción superior a los 3,600 millones de pesos. (Ramírez, 1982).

Las especies de cítricos de mayor importancia cultivada en México son la naranja (Citrus *sintesis* L. Osberck), el limón Mexicano (Citrus *aurantifolia* Cristm. Swing). La mandarina (Citrus *reticulata* Blanco) y la toronja (Citrus *paradisi* Mact)., (Ramírez, 1983).

Ramírez (1982) reporta que existen dos problemas potenciales muy serios que atentan contra la cítricultura nacional: uno es la virosis denominada "tristeza", la cual es especialmente virulenta en la combinación naranja dulce naranjo agrio ó con el limón mexicano y el otro problema es la plaga denominada Mosca del Mediterraneo (Ceratitís *capitata* Wied) la cual causa pérdidas económicas totales de la fruta.

Por otra parte, Murasique (1978) menciona que los métodos de cultivo de tejidos in vitro pueden ayudar a los mejoradores de plantas en 2 caminos generales:

- 1º) Algunas técnicas pueden ayudar ó servir para acortar los objetivos tradicionales del mejoramiento genético.

2°) Nuevos aprovechamientos del material vegetal que son resultado del desarrollo de genotipos y que no es posible obtenerlos por los métodos tradicionales, es decir hibridación y desarrollo de nuevas variedades, obtención de plantas libres de virus y propagación clonal rápida.

Así, el método de cultivo de tejidos es una promesa para desarrollar un procedimiento práctico en la propagación clonal de cítricos. Si se forman suficientes brotes por apice y si éstos producen sus propias raíces, se podrían obtener una mayor cantidad de plantas provenientes de tejidos callosos en sólo 5 ó 6 meses (Raj-Bhandsali y Arya, 1978).

Objetivos del presente trabajo son:

1) Observar el efecto de dilución del medio de cultivo y concentración de Bencilaminopurina sobre la proliferación de brotes de limón Mexicano in vitro.

2) Conocer el grado de respuesta al enraizamiento variando la concentración de Acido Naftalenacético en combinaciones con diferentes condiciones de iluminación.

3) Comprobar la efectividad de las técnicas empleadas en el cultivo de tejidos, para el caso particular de limón Mexicano.

REVISION DE LITERATURA

1.- Factores intrínsecos al medio de cultivo.

Muchos medios de cultivo han sido empleados para el cultivo de tejidos en cftricos. En los trabajos pioneros se empleó usualmente el medio de White (1943) con algunas modificaciones. Otros Medios también usados - fuerón los de Gautheret, Haller, Nitsch y Tukey (citados por Button y Kochba, 1977), completando con sustancias orgánicas tales como caseína hidrolizada (CH), leche de coco (LC), extracto de levadura (EL) y jugo de naranja (JN), frecuentemente incorporadas con varias combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento.

Los estudios sucesivos respecto al medio fuerón generalmente limitados a continuar el desarrollo de estructuras ya in vivo ó bién la proliferación de tejidos desorganizados (Button y Kochba, 1977). A partir del medio de cultivo desarrollados por Murashigue y Skoog (MS) (1962) continuaron los estudios y fué estimulado el progreso, particularmente en lo que respecta a organogénesis y embriogénesis somática.

Los elementos minerales del medio de Murashigue y Skoog (MS) son generalmente adecuados, aunque no se han encontrado los óptimos para cftricos. Esto es de acuerdo con el punto de vista que existe, sobre la consistencia de los requerimientos inorgánicos a pesar de la variabilidad en el cultivo de tejidos como ambiente controlado.

(Murashigue, 1974). La principal diferencia entre el medio MS y otras - formulaciones es en la concentración y la fuente de nitrógeno. Muchos medios contienen exclusivamente nitrato, a diferencia del MS que contiene relativamente alta concentración de amónio de adición a altos niveles de nitrato.

La sacarosa satisface los requerimientos de carbohidratos en la mayoría de los cultivos de tejidos. Una concentración de 5% fué generalmente probada como óptima en el cultivo (heterotrópico) de tejidos y órganos de cítricos (Kochba y Button, 1974).

La sacarosa aparece como necesaria para el desarrollo de embrioides inmaduros o pequeños, pero es posible no incluirla para los maduros o largos (Rangaswamy, 1959).

La omisión de la sacarosa al momento de transferir plantas al suelo es probablemente una ventaja para ser autotrófica y con seguridad incrementar la tasa subsecuente de sobrevivencia (Button y Kochba, 1977).

La glicina fué factor de incremento significativo en la obtención de callos albedos de limón (Murashigue y Tucker, 1969), generalmente en las concentraciones de 2-4 mg/l, lo mismo que otros L-Aminoácidos y la caseína hidrolizada favorecen este incremento.

La suplementación con sustancias como aminoácidos, caseína hidrolizada, extracto de malta y levadura han proveído de efectos benéficos en otros casos (Button y Kochba, 1977). Estas respuestas pueden estar dadas por dos factores, al suplir los aminoácidos particulares ó reducir la provisión de nitrógeno no incluidos en algunos medios básicos. Chaturvedi y Mitra (1974) establecieron sistemáticamente niveles óptimos de algunas vitaminas para la proliferación de callos albedos. Estos niveles, que en algunas ocasiones son altos para otros géneros, no lo son en cítricos y generalmente son los siguientes mg/l):

-) : Micinositol 100, piridoxina HCL 10, ácido nicotínico 5, tiamina HCL 10. De éstos solo la tiamina parece ser esencial, mientras que los siguientes son inactivos: Acido ascorbico, biotina, pantotenato de calcio, colina, ácido fólico y ácido paraminobenzoico.

El Acido ascorbico fué factor de realce del crecimiento en plantas Citrus natsudaïdai y la estimulación de producción de Pseudobulbos en tejido nuclear de Citrus sinensis (Kordan, 1963).

2.- Condiciones Ambientales del Cultivo.

Los factores externos o internos pueden ejercer una influencia reguladora sobre el crecimiento y la diferenciación dentro de las reacciones normales determinadas por el material genético; De todos los parámetros ambientales que influyen en el crecimiento y la diferenciación de plantas, la luz es uno de los más importantes (Boardan, 1977).

La mayoría de las plantas superiores es posible que se adapten a factores ecológicos de luminosidad en un amplio rango. Dependiendo de la intensidad de la luz durante el crecimiento, se tiene que, plantas con igual genotipo desarrollarán en forma diferente y el crecimiento de las plantas llamadas de altos o bajos requerimientos de la luz puede ser inducido. Estas adaptaciones a la variación en la intensidad de la luz y calidades de la misma, incluye cambios morfológicos, ultraestructurales, fisiológicos y bioquímicos (Bjorkman, 1981).

2.1.- Luminosidad:

Thorpe (citado por Scheider, 1982) indica que la luz es el factor ambiental que más afecta la organogénesis y desarrollo de los cultivos In Vitro y ese factor luz puede ser subdividido en: períodos de luz diario (fotoperíodo), diferentes intensidades y calidad de luz; asimismo se ha investigado la influencia de bandas de longitud de onda angosta, sobre el crecimiento y desarrollo de cultivo de callos, sin embargo comercialmente las fuentes de luz de banda amplia son más usadas.

De acuerdo a lo anterior (Murashigue 1977), las regiones de longi-

tud de onda azul y roja emitidas de lámparas fluorescentes pueden ser importantes para la propagación, no obstante existe muy poca información acerca de la efectividad de lámparas fluorescentes comúnmente aprovechables sobre crecimiento y diferenciación en el cultivo de tejidos.

En los cultivos, en los que la organogénesis y/o la embriogénesis son manejadas, puede decirse en forma general, que resulta positivo mantener una iluminación de 2000 a 3000 lux de intensidad por un periodo de una a 16 horas. (Kochba y Button, 1974).

Hunter (1982) determinó la intensidad luminosa óptima para el establecimiento de explantes de fresa, evaluando diferentes intensidades de donde se obtuvo el mejor establecimiento y crecimiento; a los 6000 lux se dió el máximo crecimiento y desarrollo de los propágulos y con 7000 lux observó la mayor iniciación y desarrollo de raíces.

Dutcher y Powell (citado por Villegas, 1982) trabajaron con plantas de manzano bajo 2 fotoperíodos diferentes, 16 y 24 hrs dfa, y 3 distancias diferentes 8, 20 y 35 cm entre tubos y lámparas, y encontraron un crecimiento apropiado al utilizar 16 hrs luz y 20 cm de separación con una temperatura de 25°C.

En particular sobre los cítricos, la alta intensidad de luz reduce la proliferación de callo de albedo, flavelos y vesículas de jugo, y así callos desdiferenciados pueden ser mantenidos en obscuridad para lograr el crecimiento óptimo (Button y Kochba, 1977).

Raj Bhansali (1978) trabajó con explantes de Citrus sinensis y aurantifolia, lo colocó en cámaras iluminadas por lámparas fluorescentes con la luz incandescente con una proporción de 3:1, te--

niendo intensidad de 3000 lux. Las lámparas se fijaron en la parte central y lateral del armario para tener iluminación uniforme y obtuvo resultados favorables.

2.2. Temperatura.

Los efectos de la temperatura sobre el crecimiento y la diferenciación no han sido estudiados adecuadamente y en ausencia de datos más específicos sobre cítricos, las temperaturas de 25-30°C aparecen cercanas al óptimo requerido y son generalmente las más usadas. De esta forma se encontró que en la propagación por cultivo de tejidos de árboles cítricos probados (Citrus sinensis y Citrus aurantifolia), la temperatura utilizada en las cámaras de iluminación, ha sido de 30°C durante el período de luz (y 28°C durante el período de luz) y 28°C en la obscuridad con un pH de 5.8 en donde, obtuvieron resultados favorables sobre el crecimiento y la diferenciación (Raj Bhan sali y Arya. 1978). Hunter et al. (1982) trabajaron con explantes y propágulos de fresa, que crecieron a 12, 16, 20, 24, 28, 32, y 36°C para determinar los efectos sobre crecimiento y desarrollo, encontrando que la temperatura óptima en donde ocurrió el máximo crecimiento fue 28°C.

Sauton et al. (1982) probó que la regeneración de brotes vegetativos y plantas completas de 4 especies de Citrus puede ser obtenida cultivando meristemas radiculares In vitro en un medio apropiado y mantenidas en obscuridad 25°C.

Lane (citado por Villegas, 1982) menciona que en el manzano cultivado In vitro a 3 diferentes temperaturas entre día y noche: 28-22, 23-17 y 18-12°C, se observa un máximo porcentaje de enraizamiento con 28°C en el día y 22°C por la noche, y con las tem

temperaturas de 18-12°C se redujo el enraizamiento y los brotes pre sentaron clorosis.

Plantas de cítricos microinjertadas y cultivadas in vitro se coloca ron en una cámara de ambiente controlado a 27°C y aproximadamente - 1000 lux. Al cabo de un mes in vitro los injertos prendidos tienen en general 2 hojas bien desarrolladas, la raíz se ha incrementado - y se encuentra lista para el trasplante al suelo (Villalobos,1978). Tusa et al. (1978) investigando por su parte sobre la tecnología de microinjertos en citrus sobre plantas completas, las que introduje- ron en bolsas de polietileno, y colocaron en cuartos con una tempera- tura entre 27-28°C, humedad relativa estimada entre 80-90%, ilumina- ción de lámparas fluorescentes de 3000 lux de intensidad, por un pe- riodo de 16 horas lux y 8 horas obscuridad, 2 semanas después ya mos traban meristemas apicales de 0.2 a 0.4 mm.

2.3. Sustrato de Cultivo.

El medio basal de Murashigue y Skoog (MS) parece proveer en forma - significativa de los requerimientos esenciales para la embriogénesis de cítricos in vitro. En ensayos anteriores sobre la inducción de - embriogénesis inicial en tejido nuclear ha resultado despreciable la falta de adición de suplementos los cuales promueven embriogénesis - cuando éstas fueron colocadas en el medio de M.S. (Rangaswamy,1959). Células solas o simples proliferaron mucho mejor cuando se propaga- ron sobre una superficie de medio sólido, que cuando fueron mezcla- dos con él, observando además una regeneración sucesiva de protoplas- tos cuando estuvieron colocados en el medio sólido (Vardi,et al.1975).

Raj Bhansali y Arya (1978) al utilizar en combinación citocininas junto con extracto de malta en medio sólido demostraron, que son eficaces para estimular la diferenciación embrionaria en -- Citrus y que el crecimiento de callo también aumenta conforme se incrementa la concentración del extracto de malta. Asimismo se mostró que el extracto de malta a 1000 mg/l es óptimo para la formación de embriones en tejidos de Citrus aurantifolia, mientras que para Citrus sinensis necesitó solamente 500 mg/l de esta substancia.

En la organogénesis cítrica sobre un medio de superficie sólida 0.6 a 1.0% de concentración de agar, se encontró que la concentración óptima para Citrus aurantifolia fué 0.7% y de 0.8% para Citrus sinensis. La menor concentración no fué crítica para el desarrollo de brotes pero las mayores concentraciones afectaron desfavorablemente el crecimiento de éstos. Aunque el 1% de concentración de agar no tuvo mucho efecto sobre el número de vástagos formados, su crecimiento se vió afectado adversamente. (Raj Bhansali y Arya, 1978).

En la mayoría de los trabajos con Citrus se ha empleado medio sólido con 0.8 a 1.0% de agar. Sin embargo parece existir una ligera ventaja con el uso de medios líquidos para el cultivo de órganos y tejidos, observando un mayor desarrollo de los embriones. (Kochhba et al. 1974).

3.- Factores a Considerar en la Proliferación

3.1.. Efecto de la luz.

Parthier (1979) opina que el crecimiento y los procesos de desarrollo de las plantas puede ser modificado considerablemente por medio de tratamientos con reguladores de crecimiento y diferentes tipos de luz.

Los efectos de las citocininas en combinación con altas y bajas - intensidades de luz, han sido descritos, utilizando Raphanus sati - vus y Sinapis alba, los que creciendo bajo condiciones de poca luz y adicionado citocininas, han demostrado cambios en el metabolismo y la estructura de los cloroplastos el cual es muy similar al re-- resultado en plantas que crecieron en condiciones de alta cantidad - de luz (Zerbe y Wild 1980 a).

Holzappel (1982a) piensa que los efectos y cambios más fuertes so-- bre las plantas en crecimiento se producen al utilizar las citoci-- ninas en combinación con la luz azul.

Plantas tratadas con citocininas muestran cambios en su metabolismo y en la estructura de los cloroplastos, los cuales son en muchos - aspectos, similares a las plantas que crecen en condiciones de alta luminosidad (Buschmann Lightenthaler, 1979).

La regeneración in vitro da muestras de ser afectada de acuerdo al ti-- po o marca de lámpara fluorescente. Scheider (1982) observó expla-- ntes foliares bajo 6 diferentes tipos de lámparas fluorescentes -- (Gro-lux, Fluora 77, Cool Withe 20, Interna 39, Warm-White de Luxe- y Lumilux 31), encontrando mejores resultados bajo los tipos de -- lámpara "Interna y Warm White de luxe", ambos tipos de lámpara emi-- tieron altas cantidades de luz naranja roja. "Fluora" fué la lámpa-- ra que marcó las diferencias inferiores y éstas se incrementaron -- aumentando las intensidades de luz, pudiendo ser a causa de una emi-- sión superior en el rango de ultravioleta (U.V.), pero al evitar la cercanía al rango U.V. fue posible evitar el efecto inhibitorio. La relación clorofila-citocromo F es un indicador adecuado para -

comparar la capacidad de absorción con la capacidad de transporte de electrones en los tilacoides. Una relación estrecha ha sido observada entre los cambios de esta relación y la tasa de alta saturación de transporte de electrones y la fijación de CO_2 en la dependencia de luz de la curva de fotosíntesis. (Grahl y Wild, 1975)

3.2. Citocininas.

Las citocininas incrementan la proliferación y la estimulación en la formación de yemas adventicias, pero también inhibe el desarrollo de raíces (Chaturvedi et.al., 1974 A).

Las citocininas son conocidas por su habilidad para estimular divisiones celulares en tejidos maduros, diferenciación y la inactivación de células mitóticas en cultivo de tejidos. También se sugiere que las citocininas juegan un papel importante en el proceso de regulación de una célula vegetal a través del ciclo de división, la hormona parece activar la transición de la fase G2 a mitosis, sin embargo, las citocininas son capaces de inducir un orden o arreglo en las respuestas fisiológicas y del desarrollo -- (Fosket y Tepper, 1978).

No obstante no se ha podido determinar como las citocininas puedan estimular el crecimiento y organización del tejido en el cultivo de nucelas (Kochba y Spiegel-Roy, 1973).

Skoog y Armstrong (1970) encontraron que en altos niveles de saturación de citocininas (10^{-4}M), solo aquellas en las que el sustituyente era un radical bencilo, como Benciladenina (BAP) produjeron cierta actividad, por lo tanto esta gran saturación comprobada con otros niveles de citocininas probadas puede ser causa o

factor de su actividad, es decir, ninguna de las otras citocininas indujo la formación de yemas adventicias cuando se encontraban en altas concentraciones.

La concentración de Benciladenina afecta el hábito de crecimiento y el número de los subcultivos de tal forma que a concentraciones altas ($10\mu\text{M}$) estimulan proliferación de brotes y yemas, mientras que a concentraciones bajas ($0.1\mu\text{M}$) se forman pocas yemas axilares. (Kane, citado por Villegas, 1982).

Raj y Arya (1978) probaron diferentes tipos y concentraciones de citocininas: Kinetina de 0.25 mg/l; Benciladenina (BA) de 5.0-80.0 mg/l; Sulfato de Adenina 5.0 a 80.0 mg/l y sus resultados muestran que la Kinetina y BA a 1.0 mg/l produjeron los embriones más grandes, y el mayor número de embriones se observó en el medio suplementado con BA.

Plumer y Fosard (1981) probaron 2 citocininas, BAP y Kinetina sobre un rango amplio de concentraciones (1.0, 3.16, 10, 31.6 y 100 mg/l) para determinar el efecto de las mismas sobre el hábito de crecimiento en Eristemon australasius y observaron que el BAP promueve formación de yemas adventicias en tanto que la Kinetina estimula el crecimiento de yemas axilares; las concentraciones más adecuadas fueron 31.6 y 3.16 respectivamente, además de que, cuando no estuvieron presentes las citocininas, el crecimiento tuvo dominancia apical. La Benciladenina a $10\mu\text{M}$, estimuló la producción de vástagos múltiples provenientes de nudos jóvenes y de nudos maduros en todas las variedades experimentadas de 5 especies e híbridos de Citrus, con lo que se indujo brotes adventicios de los entre nudos del tallo de variedades de plántulas, así mismo, se produjeron vástagos múltiples

de fragmentos apicales de algunas de las variedades de Citrus. Todas las variedades de Citrus estudiadas (C. sinensis, C. aurantium, C. reticulata, y C. limón) mostraron variación en su habilidad para regenerar plántulas in vitro como una función de origen y madurez del explante, es decir, dependiendo de la especie, edad, posición y época del año. (Barlass y Skene, 1982).

Gilaldi et al. (1979) desarrollando un método de asepsia para el cultivo in vitro de explantes provenientes de yemas de árboles cítricos, sobre un medio basal de Murashigue y Tucker, utilizarón una concentración de 10^{-5} M de Benciladenina como suplemento y obtuvieron en sus resultados un 58.5% de explantes con crecimiento vegetativo, un promedio de 2 yemas vegetativas por explante y una formación de callo de 83% de explante.

Plantas provenientes de callos de hoja de Citrus grandis y Citrus sinensis establecidas en cultivo in vitro continuo produjeron el número máximo de yemas vegetativas en un tratamiento conteniendo 0.25 -- mg/l de Bencilaminopurina (BAP) mas 0.1 mg/l de ácido Naftalenacético (ANA): el rango de variación en la concentración de citocinina -- fué de 0.15, 0.25 y 0.40 mg/l, mientras que el ANA se mantuvo constante, (Chaturvedi y Mitra, 1974 b).

Grimblat (1972) probó 3 concentraciones de BA(0.1, 1.0 y 10 mg/l) sobre la diferenciación de esquejes de Citrus madurensis in vitro en un medio basal (MS) suplementado con 0.1 mg/l de ANA y 500 mg de extracto de malta y obtuvo un máximo de iniciación de yemas de los explantes con 10 mg/l de BA y el mínimo ocurrió sobre explantes suplementados -- con 0.1 mg/l de BA.

Altman et al . (1982) cultivaron in vitro explantes de vesícula jugosa con crecimiento activo establecidos de pequeños limoneros Citrus limón en medios definidos, empleando el medio basal de Murashige y Tucker, completado con Benciladenina (BA), Acido Indolacético (AIA) y Acido Giberélico (AG_3), y se encontró que las tres hormonas en conjunto, aumentaron significativamente la acumulación de peso fresco durante un período de 16 días de acuerdo con el siguiente orden: AG_3 , BA, AIA y medio basal; La acumulación protéica por explante en medio basal, alcanzó un pico en el décimo primer día de cultivo pero tanto el AG_3 como la BA, estimularon una acumulación protéica posterior .

La embriogénesis no resulta ser estimulada por el ácido giberélico (AG_3) pero la germinación y el crecimiento de embrioides largos si es promovido (Rangaswami, 1959).

El ácido giberélico parece ser que no logra estimular el crecimiento en el cultivo de callos derivados de yemas vegetivas (Altman y Goren 1974).

Gamborg (1976) opina que en la mayoría de los casos para producción de callo es usado exclusivamente el 2,4-Da concentraciones de 10^{-6} y $10^{-5}M$, pero si se adicionan citocininas (ya sea Kinetina Zeatina o Benciladenina) en concentraciones de 10^{-6} y $10^{-7}M$ se pueden obtener efectos benéficos.

4.- Factores que influyen en el Enraizamiento.

La multiplicación vegetativa de árboles frutales a través del cultivo de tejidos in vitro ha sido muy utilizada para diferentes especies y variando las técnicas, sin embargo el enraizamiento ha resultado siempre una fase crítica de la técnica de micropropagación. Las condiciones de cultivo-

dirigidas a la inducción y crecimiento de raíces han variado de una planta a otra, dependiendo también del estado fisiológico en que se manejan (Werner y Boe, 1980).

Auxinas sintéticas, polifenoles y cofactores de enraizamiento en general, son buenos promotores, pero no es muy alentador el hecho de que su uso necesita de procedimientos empíricos en muchos casos -- (Druart, 1982), la discrepancia entre los resultados que se han obtenido puede ser originada, por la falta de tomar en consideración las etapas fisiológicas sucesivas en los procesos de enraizamiento y sus requerimientos específicos de nutrientes y reguladores.

4.1.-Efectos de la obscuridad.

El efecto positivo de la obscuridad sobre el enraizamiento ha sido probado en sus fases de inducción e iniciación de varias especies vegetales, sin embargo, no se puede generalizar con todas -- las especies que la obscuridad da buenos resultados si es aplicada en la fase de iniciación para después continuar con iluminación, siendo preferible solo durante la inducción (Grahl y Wild, 1975). Welander y Huntrieser (1980) opinan que es posible esperar diferentes respuestas al cultivo In vitro de los esquejes tomados de diversas plantas, diferentes períodos del año ó en las fases de crecimiento juvenil o adulto en que se encuentre. Druart et al. (1982) observaron que las primeras raíces podrían ser visibles entre el séptimo y doceavo día sobre el medio de enraizamiento (fases de -- iniciación); después de un mes sobre éste medio y en cuatro diferentes condiciones de luz encontraron que en condiciones de luz-luz se dió un menor porcentaje de plantulas enraizadas y en obscuridad-obscuridad fué mayor por cerca de 40%, mientras que en las -- otras dos condiciones de luminosidad obscuridad (12y16 hrs. luz) fué superior el primero, el cual indica un efecto de la obscuridad en la fase de iniciación que es superior al de la inducción.

Los mismos autores (Druart et al. 1982) a través de la obscuridad favorecieron la formación de raíces en una gran proporción de plantas, pero no siempre fue alto el número de raíces por planta; sin embargo, bajo condiciones de obscuridad-luz no produjo más raíces que las obtenidas en el régimen de completa luminosidad. Comparando ambos efectos concluyeron que el efecto de la obscuridad sobre el enraizamiento fué más benéfico en la fase de iniciación que en la inducción.

Gaspar (1977) desarrolló un sistema de modelos usando la variación en la actividad de peroxidasas como un marcador en las fases de inducción e iniciación de la formación de raíces y este sistema probó ser útil en el incremento de enraizamiento de por lo menos 3 tipos de esquejes (Cynara scolymus, Prunus persica y Prunus accolade). El procedimiento consiste en encontrar los factores químicos y/o físico controlando el incremento y decremento de la actividad de peroxidasas en el curso de la inducción e iniciación de estas fases respectivamente. El efecto de la obscuridad sobre el nivel total de compuesto fenólicos ha sido también estudiado y relacionado con la variación de peroxidasas.

4.2. Efecto de la intensidad de la luz.

Holzpfel (1982 b) probó que el ácido indolacético (AIA) indujo cambios en el metabolismo observándolo bajo diferentes intensidades de la luz. La aplicación del AIA redujo las concentraciones de los componentes bioquímicos muy por debajo de su nivel el cual no pudo ser elevado por la radiación de diferentes intensidades de luz. El con-

tenido de carbohidratos, almidones y protefnas quedó completamente sin influir por la intensidad de luz; en lo concerniente al peso seco y contenido de clorofila y citocromo f fué un incremento mínimo. Como el modo de acción de AIA sobre los parámetros investigados muestra la misma tendencia es posible suponer que el AIA opera en un punto crucial en el metabolismo celular.

Menciona el mismo autor que los cambios de todos estos parámetros por aplicaciones exógenas de AIA son característicos de reacciones de adaptación a baja intensidad de luz.

En niveles bajos de luz existe una alta relación clorofila-citocromo f correlacionada con una saturación de luz baja en la tasa de fijación CO_2 ; (Zerbe y Wild, 1980 b) trataron plantas con AIA obteniendo un valor mínimo de transportación fotosintética de electrones y fijación de CO_2 en relación con las plantas no tratadas.

Villiers y Ashton, (citados por Holzappel 1982 b) obtuvieron resultados similares después de probar tratamientos con AIA y observaron un decremento en la fijación de CO_2 , reducción de la tasa de respiración y una disminución en la síntesis de RNA, proteínas y lípidos.

En otros experimentos se probó que en los tratamientos con AIA, las plantas tratadas produjeron efectos similares o característicos de la adaptación a condiciones de poca luz (Zerbe y Wild, 1980 b).

4.3. Auxinas.

En general las auxinas inducen la formación de raíces y cuando son usadas en conjunto con las citocininas los 2 reguladores pueden es

tiumular la embriogénesis (Kochba, 1973).

Gresshoff (1978) encontro que la rizogénesis en algunas ocasiones - puede ocurrir en forma espontánea después de algunos subcultivos de callos establecidos recientemente, pero después y de la misma forma empieza a producir solo callo; sin embargo en su generalidad es posible obtener primordios de raíces en tejidos frescos, debiendo ser promovidos inicialmente por altos niveles de auxinas.

Navatel (1982) opina que el enraizamiento in vitro de árboles frutales, es sin duda la fase más difícil de superar, sobre todo si se considera que no solamente el porcentaje de plantas enraizadas es - importante, también la calidad del enraizamiento obtenido, es decir que sean raíces funcionales, puesto que ello va a condicionar en - parte el éxito en el establecimiento a tierra. Estos resultados dependen de la riqueza del medio de cultivo en elementos minerales y - en auxinas, pero igualmente, a la fase precedente al enraizamiento. En base a esto Navatel (1982) sugiere la utilización de ciertas téc - nicas que incrementan porcentaje y calidad del enraizamiento, éstas son:

- a) Pasar las plantas a una fase de "alargamiento", es decir, transferirlas a un medio de cultivo sin auxinas, ni citocininas durante 2 ó 3 semanas, lo que va a permitir obtener y manejar plantulas más homogéneas y que serán más activas al estímulo auxínico - para lograr su enraizamiento.
- b) Transferir y fijar un límite de permanencia de las plantas sobre el medio conteniendo la auxina, con duración de 4 y 8 semanas, - para después ser transferidos al mismo medio pero sin auxinas. - En presencia de las auxinas se favorece la inducción de las raíces, pero si continúa en el mismo medio, se inhibe el alargamien

to de las mismas. La utilización de esta técnica no aumenta en forma importante el porcentaje de plantas enraizadas, sin embargo favorece la calidad de enraizamiento y es ello lo que permite obtener un mejor establecimiento a tierra.

Gorst et al. (1981) probaron la influencia de las auxinas y minerales sobre el enraizamiento de Eucalyptus ficifolia in vitro en un medio basal descrito por ellos y adicionando 6 auxinas (AIA, AIB, ANA, ANO, ApCP y 2,4-D) cada una de $5\mu\text{M}$ en un solo tratamiento de amplio espectro y 10 auxinas probadas en forma individual (AIB, AIA, ApCP, 2,4-D, ANO, ANA, ANA, AIProp, AIPyr, 2,4,5-T) cada una a $5\mu\text{M}$, combinando 2 concentraciones de riboflavina, una en presencia de $10\mu\text{M}$ y en ausencia de tal vitamina; obteniendo un enraizamiento de 100% con las auxinas ANA, AI Prop y AIPyr, cuando la Riboflavina fué excluída y que aparentemente las auxinas eran inactivas en presencia de Riboflavina bajo la luz.

Villegas (1982) reporta que al utilizar 1 mg/l de AIB en el medio de cultivo se promueve alta división celular favoreciendo crecimiento de callo y éste impide que se desarrollen las raíces; el fluoroglucinol por su parte tiene un efecto benéfico sobre el enraizamiento ya que cuando no se utiliza, la formación de callo se incrementa, al aumentar la concentración de AIB, y las raíces son deformes.

Plumer y Fossard (1981) intentaron inducir la formación de raíces utilizando un medio basal que denominaron "E" probando auxinas individuales y eliminando las citocininas; el medio contenía diversas concentraciones de todos los reguladores de crecimiento

con excepción de la riboflavina; las auxinas que se probaron en forma individual a $6 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$, fueron: AIA, AIB, ANA, ANO, ApCP y 2,4-D, y la auxina que les dió mayor formación de raíces fué ANA a una concentración de $10 \mu\text{M}$.

En especies de Citrus, (Mitra y Chaturvedi, 1974 A) con porciones de tallo en un medio complementado con extracto de malta, obtuvieron alta multiplicación de callo, pero no se dió la brotación de yemas o crecimiento de raíces, sin embargo en un sistema similar, en presencia de extracto de malta, Benciladenina y Acido Naftalenacético observaron un incremento en el número y vigor de las raíces obtenidas.

En algunos casos el 2,4-D es más activo que ANA, el cual a su vez es más activo que AIA, sin embargo parece que las auxinas no son esenciales para la proliferación de callos de cítricos particularmente en explantes de tejidos de fruta inmadura (Kochba y Spiegel Roy, 1973).

Uno de los efectos más notables de AIB en el cultivo de tejidos de Citrus ha sido en general la promoción de la formación de raíces y en algunos casos crecimiento de brotes (Primo y Aranda, 1976).

En experimentos sobre enraizamiento, utilizando varias concentraciones de ANA en μM : 0.1, 1.0, 3.16, 10, 31.6 y 100 en combinaciones con 3 niveles de BAP (μM): 0.1, 0.0316 y 0.01, se logró un máximo de 40% de enraizamiento en el medio que contenía $31.6 \mu\text{M}$ de ANA y $0.0316 \mu\text{M}$ DE BAP (Plumer y Fossard, 1981).

Plántulas de Citrus desarrolladas in vitro presentaron un requerimiento de altos niveles de auxina exógena para lograr el enraic.

Barlass y Skene (1982) sobre un medio basal de White (1943) completando con ANA o AIB se observó que, para que los vástagos desarrollados in vitro enraicen en un porcentaje aceptable se necesitan $10\mu\text{M}$ de ANA exógena. También compara el efecto de ANA y AIB en plántulas "jóvenes" y "maduras", el primero de los reguladores a concentraciones de 0.5 y $5\mu\text{M}$ con plántulas "jóvenes" y se obtuvo un 25% y 80% de enraice respectivamente; el segundo (AIB) a $5\mu\text{M}$ dió un 10% de enraice, siendo eliminado por su inferioridad en tal porcentaje, en plántulas "maduras" a 5 y $10\mu\text{M}$ de ANA se encontró un 25 y 80% respectivamente y la presencia del ANA a $25\mu\text{M}$ no elevó más el porcentaje de enraice tanto en las plántulas "jóvenes" como en las "maduras". Las plántulas "jóvenes" de la naranja trifoliata enraizaron fácilmente en el medio que contenía $5\mu\text{M}$ de ANA (60% con 2 raíces por plántula) y $10\mu\text{M}$ de ANA (90% con 5 raíces por plántula). En este caso las raíces se produjeron después de 3 semanas de exposición a $10\mu\text{M}$ de ANA (tanto para plántulas de Citrange jóvenes como maduras). Una vez que las raíces habían iniciado, las plántulas jóvenes pasaron del medio de enraice al medio basal de White (1943) libre de auxinas donde continuó la prolongación de la raíz.

Grinblat (1972) obtuvo formación inicial de raíces en explantes de Citrus madurensis sobre un medio basal de Murashigie y Skoog (1962) suplementado con 0.1 mg/l de ANA y 500 mg/l de extracto de malta, el enraice ocurrió 3 semanas después de la implantación. Del esqueje, la iniciación de las raíces ocurrió después de la formación de yemas y brotes, sin embargo ambos crecieron simultáneamente y la raíz alcanzó a llegar al fondo del tubo de ensayo -

empezando a enrollarse. No fueron observadas raíces laterales - sobre la nueva planta mientras estuvo creciendo en el tubo de - cultivo.

Altman y Goren (1977) para dar origen a la rizogénesis en callos y plantulas diferenciadas de cítricos, probaron varias auxinas: AIA, ANA, AIB, y 2,4-D, a una concentración de 0.1-0.5 mg/l las tres primeras y 0.25 mg/l la última, y únicamente se produjeron raíces en un medio que contenía 0.5 mg/l de ANA, y callosidad en - lugar de raíces con 2,4-D.

Para la iniciación del enraice en explantes de Citrus sinensis y Citrus aurantifolia se emplearon varias auxinas como: ANA, AIB, AIA, y 2,4-D (cada una 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l) y la Kinetina (0.1-0.2 mg/l) en diferentes combinaciones (Raj y Arya, 1978), los - cultivos se incubaron en la obscuridad y las respuestas organo- genéticas se notaron después de 30 días para luego ser transfe- ridas a un medio que contenía únicamente sales inorgánicas. La - incorporación de ANA (1.0-2.0 mg/l) inició la formación de raíz en ambos tejidos en un mayor número que el AIA y AIB mientras - que la formación de raíces se inhibió en un medio que contenía - 2,4-D (0.5-2.0 mg/l); El desarrollo de raíces se intensificó - enormemente al reducir la concentración de sacarosa de 5 al 2%. Navarro et al. (1979) cultivaron in vitro óvulos provenientes - de frutos pequeños (ocho semanas de edad) de Citrus sinensis en - un medio básico conteniendo las sales minerales de MS suplemen- tado con 100 mg/l de Inositol, 1 mg/l de Clorhidrato de Pirido- xina, 1 mg/l de Acido Nicotínico, 0.2 mg/l de Clorhidrato de -

Tiamina, 500 mg/l de Extracto de Malta, 50 gr/l de Sacarosa y 10 gr/l de Bacto Agar, agregando también Acido Giberelico (1 mg/l) o Sulfato de Adenina (27 mg/l) para lograr la embriogénesis de óvulos. La formación de raíces se produce a la 2a. semana del cultivo y la de tallos entre la 3a y 4a semana, obteniendo un porcentaje de embriones con raíz y tallo del 77% y al cabo de 4-8 semanas del cultivo de embriones se lograron plantas con una altura de tallo de 2-3 cm.

Embrioides de Citrus obtenidos anteriormente, formaron las raíces sobre un medio básico de MS suplementado con Acido Giberélico (AG₃) y/o sulfato de Adenina (SA), que ocasionaron la iniciación de raíces en las primeras fases de desarrollo de los embrioides, sin embargo afectaron la emergencia. La Sacarosa de 5 a 6% fué la concentración óptima para el enraizamiento. (Kochba y Spiegel-Roy, 1977).

Chaturvedy y Mitra (1974 A) experimentando con la propagación clonal de ANA y AIB sobre el enraizamiento a concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 mg/l de cada una, encontraron que las raíces más vigorosas fueron las del tratamiento que contenía 0.5 mg/l de ANA y los primordios de raíz fueron visibles después de 10-30 días de incubación.

5. Conclusiones sobre la Revisión de Literatura.

Es factible la obtención de plantas de cítricos a partir del cultivo de tejidos, utilizando generalmente los elementos minerales del medio de Murashige y Skoog (MS), aunque no se han encontrado los óptimos para cítricos.

De los parámetros ambientales que influyen en el crecimiento y diferenciación de las plantas, la luz es uno de los más importan

tes porque puede ejercer una influencia reguladora dentro de las reacciones normales determinadas por el material genético. De la misma forma los cambios y efectos más fuertes en el crecimiento y los procesos de desarrollo de las plantas se producen al utilizar reguladores de crecimiento vegetal y diferentes tipos de luz. La mayoría de los cultivos in vitro de cítricos han sido mantenidos sucesivamente sobre un sustrato de medio sólido de agar, donde la concentración óptima parece variar en cada especie, sin embargo una mayor concentración afecta desfavorablemente. Existe también una ligera ventaja con el uso de medios líquidos como sustrato para el cultivo de órganos y tejidos, observando un mayor desarrollo de embriones.

Con respecto a la concentración y tipo de citocininas, se sabe que afecta el hábito de crecimiento, el número de subcultivos, número y tamaño de embriones, variando en cada citocinina probada la concentración más adecuada, sin que existan diferencias entre especies e híbridos de Citrus.

Para los efectos de proliferación de explantes de cítricos se reporta que existe variación en su habilidad para regenerar plántulas in vitro, como una función del origen y madurez del explante, es decir dependiendo de la especie, edad, posición y época del año.

Las condiciones de cultivo dirigidos a la inducción y crecimiento de raíces varían de una planta a otra y dependiendo también del estado fisiológico en que se manejan para considerar sus requerimientos específicos de nutrientes y reguladores.

El enraizamiento in vitro de árboles frutales, es sin duda la fase más difícil de superar porque debe considerarse porcentaje de plantas enraizadas y calidad de enraizamiento, ello depende de la riqueza del medio de cultivo en elementos minerales y en auxinas a una determinada concentración para lograr la inducción de raíces, ya que al utilizar concentraciones elevadas favorece el desarrollo del callo. Se reportan diferencias estadísticas significativas sobre el enraizamiento de cítricos in vitro dependiendo del tipo y concentración de auxinas exógena y en combinación con extracto de malta, citocininas y en presencia o ausencia de luz.

El efecto de la obscuridad sobre el enraizamiento ha sido probado como efectivo en las fases de iniciación y/o inducción de raíces de varias especies vegetales, aunque no se puede generalizar con todas las especies vegetales, ni la fase sobre la que tiene un mayor efecto.

Cambios en la intensidad de la luz tienen efectos reducidos sobre el metabolismo celular, si es que fué aplicada auxinas en forma exógena, porque existe una interacción en las plantas tratadas que produce efectos similares o característicos de la adaptación a condiciones de poca luz.

MATERIALES Y METODOS

1.- Localización:

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del cultivo de tejidos del Centro de Fruticultura en el Colegio de Postgraduados en Chapingo, México.

Se utilizaron yemas axilares de brotes de crecimiento activo de limón-Mexicano Citrus aurantifolia. Después de estar ya establecidas las yemas en las condiciones del cultivo in vitro, se inició el experimento; en la primera parte fueron sometidas a proliferación y posteriormente a enraizamiento.

2.- Medio del Cultivo:

El medio básico empleado fué el de Murashigue y Skoog (MS)(1962), con algunas modificaciones, el cual ha sido utilizado comunmente para la propagación in vitro de portainjertos cultivares de una gran diversidad de especies (Cruz, 1983).

El medio de cultivo MS se elaboro de la siguiente manera: primero fueron preparados grupos de sales minerales (Soluciones MADRE I,II,III,IV y V; Apéndice A) de las cuales se emplearon 10 ml de cada una para preparar un litro de medio de cultivo a una concentración del 100% y se vertieron sobre un matrás aforado de 1 litro que contenfa 600 ml de agua tridestilada, siguiendo el órden correspondiente. Se suplemento el medio con 10 ml/l de tiamina, 5 ml/l de mioinositol, 30 gr/l de sacarosa, 5 gr/l de Agar-Agar y el PH se ajustó con todos los casos a 5.5, con ~~NAOH~~ NaOH o HCL 1N y fué medido con un potenciómetro. Para que se disolviera el agar se colocó en "baño marfa" dentro de una olla de presión (90°C durante 15 minutos), posteriormente se vació en tubos de ensaye de fon-

plano de 160 x 25 mm utilizando una jeringa de flujo continuo, agregando 12 ml del medio de cada tubo, los cuales fueron tapados perfectamente con papel aluminio y colocados en una autoclave a 20 lb de presión a 121° C durante 15 minutos a fin de esterilizarlos y dejarlos enfriar en posición inclinada para que exista mayor superficie de contacto. Los reguladores de crecimiento variaron de acuerdo al experimento que se estuviese realizando y de la forma en que se mencionará.

3.- Proliferación:

La primera parte de proliferación está dividida en implantación inicial y 3 transferencias subsecuentes: cada una a su vez lleva características propias, un esquema particular y parámetros diferentes.

3.1. Implantación inicial

Se utilizaron las sales minerales del medio MS en cuatro concentraciones (100,75,50 y 25%) complementado con dos reguladores de crecimiento vegetal, estos son: Bencilaminopurina (BA) y Acido Indolbutirico (AIB), éste a concentraciones de 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/l (Cuadro 1.)

CUADRO 1 TRATAMIENTOS CONSIDERADOS PARA LA IMPLANTACION DE LIMON MEXICANO

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DEL MEDIO (MS) (%)	BA (mg/l)	AIB (mg/l)
1	100	0.4	0.2
2	100	0.6	0.2
3	100	0.8	0.2
4	100	1.0	0.2
5	75	0.4	0.2
6	75	0.6	0.2
7	75	0.8	0.2
8	75	1.0	0.2
9	50	0.4	0.2
10.	50	0.6	0.2
11	50	0.8	0.2
12	50	1.0	0.2
13	25	0.4	0.2
14	25	0.6	0.2
15	25	0.8	0.2
16	25	1.0	0.2

3.2. Primera transferencia.

Para la primera transferencia se emplearon aquellos tratamientos que durante la implantación inicial, los explantes mostraron una mayor respuesta respecto a la formación y desarrollo de brotes, con el propósito de observar la respuesta y grado de proliferación de los brotes formados. Los tratamientos elegidos así fueron 2,3,4,10,11, y 12 del cuadro 1, conservando los demás explantes en el medio de la implantación inicial.

3.3. Segunda transferencia.

En la segunda transferencia fueron repetidos los mismos medios de la primera, es decir, los que corresponde a los tratamientos 2,3,4,10,11 y 12 (cuadro 1) con la diferencia de que se utilizaron explantes provenientes de la implantación inicial y que permanecieron en dicho medio por espacio de 6 semanas, a diferencia de la transferencia anterior, que estuvieron 4 semanas en el mismo medio; esto fué pensado con la idea de encontrar diferencias en el tiempo de exposición al medio antes de ser transferido.

3.4. Tercera transferencia.

En esta ocasión se pensó en aumentar la concentración de BA a 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l y la concentración de AIB se mantuvo constante 0.2 mg/l, las sales minerales de MS fueron diluidas al 50% por haber sido considerada la más adecuada, mientras que la Tiamina Dicloro, el Mioinositol, la Sacarosa y el Agar fueron repetidos a la misma concentración (es decir 1.0 mg/l, 100 mg/l, 30 gr/l y 5 gr/l respectivamente) ajustando nuevamente el PH a 5.5 con NaOH (IN). Con la intención de hacer más objetivo el esquema experimental para proliferación

se presenta un diagrama de flujo. (Figura 3-A).

4. Enraizamiento.

La segunda parte del experimento, enraizamiento, está dividida en cuatro etapas también, designadas como: 1° ensayo, 2° ensayo, 3er ensayo y esquema final; este último fué subdividido en dos fases porque se repitió pero con dos variantes. De la misma forma que en la primera parte - cada etapa lleva características propias, un esquema particular y parámetros diferentes.

4.1. Primer ensayo,

Se utilizaron las sales minerales de MS a 50% y 2 concentraciones de ANA (0.5 y 1.0 mg/l) junto con BA (0.1 mg/l), y dos semanas después de mantener en ese medio la mitad correspondiente a una y otra concentraciones de ANA fueron transferidas a un medio que no contenía reguladores de crecimiento, para permanecer tres semanas más en ese medio.

4.2. Segundo ensayo.

Para el segundo ensayo fueron utilizadas dos concentraciones de sales minerales (100 y 50%), 2 concentraciones de ANA (0.5 y 1.0 mg/l) y dos condiciones de cultivo (bajo luz y completa oscuridad) La concentración utilizada de BA fué de 0.1 mg/l. (Cuadro 2)

CUADRO 2. TRATAMIENTOS CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO.

CONCENTRACION DEL MEDIO	CONCENTRACION DE LA AUXINA	CONDICIONES DE LUZ
100 %	0.5 mg/l ANA	Bajo luz (16 hrs)
100 %	0.5 mg/l ANA	Obscuridad (24 hrs)
100 %	1.0 mg/l ANA	Bajo luz (16 hrs.)
100 %	1.0 mg/l ANA	Obscuridad (24 hrs.)
50%	0.5 mg/l ANA	Bajo luz (16 hrs.)
50 %	0.5 mg/l ANA	Obscuridad (24 hrs)
50 %	1.0 mg/l ANA	Bajo luz (16 hrs)
50 %	1.0 mg/l ANA	Obscuridad (24 hrs.)

4.3. Tercer ensayo

SE empleó solamente una concentración del medio de cultivo (50%) y se cambió la hormona auxínica ANA por AIB, probándola a dos concentraciones diferentes (0.5 y 1.0 mg/l); para este caso se usó una concentración un poco mayor de BA con respecto a los ensayos anteriores, es decir 0.2 mg/l.

4.4. Esquema final del enraizamiento.

Esta última etapa se dividió en dos fases con características semejantes, pero en la segunda se incluyen 2 variantes, es decir, que para la tercera y cuarta semana los tubos fueron llevados a -

luz roja continua, eliminando las horas de obscuridad, la otra - variación manejada fue, que todos los brotes al momento del im- plante fueron inclinados hacia abajo.

4.4.1. Primera fase.

Fué utilizada una concentración del medio de cultivo - (50%), 3 concentraciones de ANA ($5\mu\text{M}=0.93\text{mg/l}$; $10\mu\text{M}=1.862\text{mg/l}$; $15\mu\text{M}=2.793\text{mg/l}$) 3 condiciones de luz empleadas (luz - blanca, luz roja y completa obscuridad) y todos los tubos fueron transferidos a un medio sin reguladores de creci- miento en la 4a. semana para permanecer otras cuatro sema- nas en ese medio. La concentración de BA que uso siempre fué 0.2 mg/l. Cuadro 3.

4.4.2. Segunda fase.

Con las mismas características que la fase anterior, pero con la modalidad de permanecer solo 2 semanas en condicio- nes de luz blanca, roja y obscuridad completa y 2 semanas bajo luz roja continua, para después ser transferidos a - un medio sin auxinas y con 12 hrs. por día de luz roja, - para permanecer así otras cuatro semanas. Cuadro 3.

CUADRO 3. TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS EN EL ESQUEMA FINAL DEL ENRAIZAMIENTO EN SU 1a. Y 2a. FASE CON RELACION A LAS SEMANAS DE PERMANENCIA EN EL MEDIO Y BAJO CUATRO DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ.

CONCENTRACION AUXINICA (ANA)	CONDICION DE LUZ	PERMANENCIA EN EL MEDIO			
		1a. Fase/semanas		2a. Fase/semanas	
		c/auxinas	s/auxinas	c/auxinas	s/auxinas
5 μ M	1. Blanca (12 hrs)	4	4	2	-
	2. Roja (12 hrs)	4	4	2	-
	3. Oscuridad (24 hrs)	4	4	2	-
	4. Luz roja (24 hrs) Continuas con todos los tubos.	-	-	2	4
10 μ M	1. Blanca (12 hrs)	4	4	2	-
	2. Roja (12 hrs)	4	4	2	-
	3. Oscuridad (24 hrs)	4	4	2	-
	4 Luz roja (24 hrs) continuas con todos los tubos.	-	-	2	4
15 μ M	1. Blanca(12 hrs)	4	4	2	-
	2. Roja (12 hrs)	4	4	2	-
	3. Oscuridad (24 hrs)	4	4	2	-
	4. Luz roja (24 hrs) continuas con todos los tubos.	-	-	2	-
	5. Luz roja (12 hrs) por dfa con todos los tubos.	-	-	-	4

En la figura 4 se presenta un diagrama de flujo para hacer más comprensible el desarrollo experimental.

5. Implante del material.

Para el implante de dicho material vegetativo (sea éste de la implantación, transferencia y ensayo) se utilizó una campana de aire con flujo laminar y mecheros de alcohol para mantener las condiciones de asepsia. Antes del implante, todos los tubos fueron flameados por la boca del tubo que había sido tapada previamente con aluminio. Se implantaron -- inicialmente brotes que ya estaban adaptados a las condiciones In vitro y en cada una de las transferencias eran separados cada uno de los brotes para ser colocados en tubos -- con medios de cultivo nuevos utilizando para ello bisturí y pinzas de disección, los cuales eran colocados en alcohol -- al 96% y pasados por fuego antes de cada corta.

Después de cada implante del material vegetativo dentro del tubo de ensayo, la tapa de aluminio se introduce en alcohol al 96% y se flanea antes de cubrir o tapar el tubo.

6. Condiciones de Incubación.

Los brotes que fueron sometidos a condiciones de luz blanca, se incubaron en el cuarto de cultivo con ambiente controlado, el fotoperíodo se reguló a 16 hrs luz por día, utilizando un reloj midtex Cyclomaster, con una intensidad lumínica de 1500 lux aproximadamente, con luz emitida por lampara -- fluorescente; la temperatura se controló a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, empleando un calentador IEM solar automático. Se colocaron los -- tubos sobre repisas de cristal y se mantuvo cerrada la puerta para evitar la introducción de cuerpos o partículas extrañas.

Los tubos destinados a completa obscuridad fueron depositados sobre una caja de madera ~~en~~ el mismo cuarto, dicha caja --

estaba forrada por dentro y por fuera de negro y colocada sobre una silla para que no estuviese en contacto con el suelo frío. Se utilizó también un aparato de control ambiental marca CONVI-RON con el cual se manejó el fotoperíodo de diferentes horas -- luz (12, 16 y 24 hrs de luz blanca o roja según el caso) y la -- temperatura a 28°C de día y de noche.

7. Material y Equipo de Laboratorio.

7.1. Materiales:

- Tubos de ensayo de fondo plano de 25x160mm.
- Vasos de precipitado de 20 y 100 ml.
- Matraces aforados de 500 a 1000 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- Pipetas graduadas de 1.5 y 10 ml.
- Rejillas circulares metálicas de 28 cm. de diámetro
- Pinzas de disección
- Ligas de hule del No. 18 y 64
- Mangos para bisturí
- Navajas para bisturí No. 11
- Mecheros de alcohol
- Papel aluminio 1001 usos (Raynolds Wrap)
- Marcador Esterbrook
- Reactivos químicos.

7.2 Equipo

- Autoclave vertical modelo popular
- Esterilizador de presión
- Potenciómetro de presión
- Potenciómetro (Corning Model. 12)
- Balanza analítica (Sartorius 0.0001 g)

- Balanza granataria digital (Ohaus 1500 D)
- Jeringas de flujo continuo (Cronwell 10 ml.)
- Cuarto de implantación con campana de aire con flujo laminar.
- Cuarto de incubación con control de temperatura y fotoperíodo y 12 lámparas fluorescentes
- Calentador (solar automático IEM)
- Conviron con control de: fotoperíodo tipo o calidad de luz y transferencias.

8. Fechas de implantación y transferencias.

El 26 de abril de 1983 se realizó el implante inicial para permanecer cuatro semanas y hacer la primera transferencia el 23 de mayo de 1983, dos semanas más y se tomaron tubos de implante inicial para hacer la 2a. transferencia el 8 de junio de 1983; finalmente el 22 de julio de 1983 se realizó la 3a. transferencia, después de haber permanecido siete semanas en el medio -- del implante inicial (figura 1.).

Con respecto al enraizamiento el 1o, 2o y 3er ensayo se realizaron a la vez que se hacían las tres transferencias para proliferación (es decir, el 23 de mayo, 8 de junio y 22 de julio-1983 respectivamente). Para el esquema final de enraizamiento en su primera fase fueron implantados los brotes el primero de julio/83 para ser transferidos posteriormente a un medio sin auxinas el 1o. de agosto /83, mientras que en la segunda fase los brotes fueron colocados el 16 de agosto/83 en un medio con auxinas y llevados a un medio sin ellas (figura 2).

En todos los casos se hicieron cuatro observaciones semanales de investigación, pero se consideró que a la segunda, tercera y cuarta semana existían cambios cualitativos y/o cuantitativos,

sin existir efectos importantes en la primera semana de observación.

9. Diseño experimental:

9.1. Proliferación.

Se utilizaron brotes de limón Mexicano provenientes de yemas axilares ya adaptados a las condiciones In vitro. El diseño experimental empleado fué parcelas divididas --- (D.P.D.) con arreglo completamente al azar; se realizaron 4 experimentos que se condujeron en forma independiente, en donde variaron los factores de estudio y de ésta forma se exponen por separado (figuras 1 y 3).

9.1.1 Implantación inicial.

Fueron diseñados un total de 16 tratamientos con cuatro parcelas de acuerdo a la concentración del medio (100, 75, 50, 25%) y cuatro subparcelas para BA-- (0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml/l), con 3 repeticiones de 5 tubos cada una, por 5 tubos de ensayo, el total de tubos fué 240.

Los factores de estudio fueron:

-Medios: Completo (100% de concentración de sales minerales de MS) y diluido (75, 50 y 25% de la concentración del medio MS).

-Reguladores de crecimiento: dosis de Bencilaminopurina (BA) 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/l)

-Categorías de evaluación: 7

- a) Proliferación (> 2 brotes)
- b) Crecimiento (> 1 cm)
- c) Crecimiento y Proliferación (> 1 cm y > 2 brotes)
- d) Crecimiento y Proliferación lento (≤ 1 cm y ≤ 2 brotes)

- e) Total de número de brotes pequeños (≤ 1 cm)
- f) Total de número de brotes grandes (> 1 cm)
- g) Total de brotes obtenidos

9.1.2. Primera y segunda transferencia.

Se agruparon en este caso las dos transferencias porque son exactamente los mismos tratamientos - con la única variante de que en la 1ª transferencia se utilizaron brotes del implante inicial -- con 4 semanas de permanencia en ese medio, mientras que para la 2a. transferencia se emplearon brotes del implante inicial con 6 semanas de permanencia en el mismo medio.

De esa forma tenemos que, fueron planteados 6 -- tratamientos con 2 concentraciones del medio -- (100 y 50%) y 3 de BA (0.6, 0.8, 1.0 mg/l), con -- dos repeticiones de 5 tubos cada una y la unidad experimental estuvo constituida por 5 tubos de -- ensaye, el total de tubos fué 120, que corresponden 60 a cada transferencia.

Los factores de estudio fueron:

- Medios: completo (100% MS) y diluido (50% MS)
- Reguladores de crecimiento: dosis de BA (0.6, -- 1.0 mg/).
- Categorías de evaluación: en proliferación y/o crecimiento. (a, b, c, d = 4)

9.1.3. Tercera transferencia.

Fue planteada con solo 3 tratamientos, es decir -- solo varió la concentración de BA, que fué aumen-

tada con respecto a los casos anteriores (1,2,3 mg/l), mientras que la concentración del medio se conservó diluido a la mitad (50%), para esto fueron utilizadas 4 repeticiones con 5 tubos cada una y también estuvo constituida por 5 tubos la unidad experimental, el total de tubos empleados fué de 60.

Los factores de estudio fueron:

- Reguladores de crecimiento:dosis de BA más altas que las anteriores (1,2 y 3 mg/l).
- Categorías de evaluación: en proliferación y/o crecimiento (a,b,c,d = 4).

9.2. Enraizamiento.

Se tomaron brotes provenientes de implantación inicial para hacer los tres primeros ensayos, posteriormente y para el esquema final de enraizamiento fueron utilizados brotes de las tres transferencias de proliferación ya evaluadas. El diseño experimental utilizado fué parcelas divididas (D.F.D.); se realizaron tres ensayos experimentales antes de plantear el esquema final, fueron conducidos y analizados independientemente ya que variaron los factores de estudio y por si mismo se irán tratando por separado (figura 2 y 4).

9.2.1. Primer ensayo:

Se partió inicialmente con 2 tratamientos variando la concentración del Acido Naftalenacético (ANA) en 0.5 y 1.0 mg/l) y una concentración -

del medio de 50%, pero después de 2 semanas de incubación la mitad de los tubos de cada tratamiento fueron llevados a un medio que no contenía reguladores de crecimiento, se utilizaron 2 repeticiones con 5 tubos cada una, la unidad experimental estuvo constituida por 5 tubos de ensayo y fué 20 el total de tubos utilizados.

Los factores de estudio fueron:

Reguladores de crecimiento: dosis de Acido Naf--talenacético (ANA) (0.5 y 1.0 mg/l)

-Permanencia en el medio: cuatro semanas de permanecer en un medio con auxinas y otro tratamiento con dos semanas de exposición a las auxinas y dos semanas en un medio libre de reguladores de crecimiento.

-Categorías de evaluación(6)

- u) sin cambio permanente
- v) engrosamiento de base
- w) iniciación de callo
- x) callo bien formado
- y) primordio de raíz
- z) raíz bien formada

9.2.2. Segundo ensayo.

Con un total de 4 tratamientos se planteó éste ensayo, empezando con una concentración del medio (50%), dos concentraciones de ANA (0.5 y 1.0 mg/l) y dos condiciones de incubación (bajo luz 16 hrs y en completa oscuridad 24 hrs). De esta forma se tienen 2 repeticiones de 5 tubos cada una, la --

unidad experimental se formó con 5 tubos y 20 tubos empleados en total.

Los factores de estudio fueron:

-Reguladores de crecimiento:dosis ANA (0.5 y 1.0 mg/l).

-Condiciones de luz: la mitad de los tubos correspondientes a una y otra concentración de ANA fueron colocados en completa obscuridad (24 hrs) y el resto bajo luz blanca (16 hrs).

-Categorías de evaluación: las mismas establecidas en el primer ensayo de enraizamiento.

(u,v,w,y,x,z = 6)

9.2.3, Tercer ensayo.

El regulador de crecimiento auxínico fué cambiado por Acido Indolbutírico (AIB) probado en 2 concentraciones diferentes (0.5 y 1.0 mg/l) y una concentración de citocininas, es decir Benciladenina -- (BA), un poco mayor que la utilizada en los dos ensayos anteriores. Se plantearon 4 repeticiones con 5 tubos cada una por unidad experimental y un total de 40 tubos que se utilizaron.

Los factores de estudio fueron:

-Reguladores de crecimiento: fué cambiada la auxina ANA por AIB en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/l y la concentración de la citocinina BA fué elevada de 0.1 a 0.2 mg/l.

-Categorías de evaluación: las ya establecidas para enraizamiento (u,v,w,x,y,z=6)

9.2.4. Esquema final.

Subdividido en dos fases, este esquema final de en

raizamiento, se planteó pensando en obtener muy buenos resultados, ello en base a la tendencia demostrada por los brotes para formar sus propias raíces y según cada uno de los ensayos anteriores.

El planteamiento fué muy semejante para una y otra fase, por lo tanto, se agruparán en los aspectos generales y en los particulares se harán mención sobre las variantes establecidas.

El total de tratamientos fué 18, nueve por cada fase, se estableció una sola concentración del medio de cultivo (50%), 3 concentraciones altas de ANA- ($5\mu\text{M} = 0.931 \text{ mg/l}$, $10\mu\text{M} = 1.862 \text{ mg/l}$, $15\mu\text{M} = 2.793 \text{ mg/l}$), y se emplearon 3 condiciones de luz (luz blanca por 12 hrs, luz roja por 12 hrs y oscuridad por 24 hrs). Fueron utilizadas 2 repeticiones con 5 tubos cada una, con 5 tubos también quedó formada la unidad experimental y el total de tubos fué 180 correspondiendo 90 a cada fase.

Para la primera fase se mantuvieron todos los tubos en las 3 condiciones de luz (blanca, roja y oscuridad) tanto en las cuatro semanas que permanecieron en un medio con auxinas, como en las otras cuatro semanas que fueron llevadas a un medio sin reguladores de crecimiento.

En la segunda fase, durante las cuatro semanas que tuvieron los brotes en el medio con auxinas, dos semanas se incubaron bajo 3 condiciones de luz (blanca y roja por 12 hrs. y oscuridad las 24 hrs) para después ser llevados todos los tubos a luz roja con

tínua (24 hrs) las dos semanas restantes y al ser transferidos a un medio que no contenía reguladores de crecimiento se volvieron a colocar por espacio de 4 semanas más a luz roja 12 hrs por día. Una segunda variante en esta fase fué que todos los brotes al momento de la transferencia fueron colocados acostados o casi de cabeza, puesto que la superficie del medio lleva un declive de 45°aproximadamente.

Los factores generales de estudio fueron:

- Reguladores de crecimiento: tres dosis de ANA- --
(5 μ M = 0.931 mg/l; 10 μ M = 1.862 mg/l, 15 μ M = 2,793mg/l)
- Condiciones de luz: para la primera fase fué luz blanca (12hrs), luz roja (12 hrs) y oscuridad -- (24 hrs) por espacio de 8 semanas; mientras que en la fase segunda, 2 semanas con luz blanca --- (12 hrs), luz roja (12 hrs)y oscuridad (24 hrs), otras 2 semanas solo con luz roja (24 hrs) y las últimas 4 semanas la luz roja se redujo (12 hrs-- por día).
- Permanencia en el medio:para ambos casos, la estancia de los brotes en un medio con auxinas fué de 4 semanas y las otras cuatro semanas transferidas a un medio libre de reguladores de crecimiento.
- Categorías de evaluación: 6 que son las que se establecieron desde un principio para enraizamiento (u,v,w,x,y,z= 6).

10. Toma de datos.

La toma de datos se realizó en base a las categorías de evaluación establecida; así tenemos 4 para prolife

ración y 6 para enraizamiento, en donde se hacían observaciones semanales sobre el desarrollo general de los brotes establecidos.

10.1. Proliferación.

De los 5 tubos que consistían una unidad experimental, se contaba el número de tubos que correspondía a cada categoría: a,b,c,d.

Solo para el caso de la implantación inicial se consideraron otros parámetros por considerarse que da una muestra general del comportamiento en todos los casos puesto que se manejaron todas las variables; de ésta forma se consideró: e,f,g.

En los experimentos sobre proliferación, la variable tamaño de planta se evaluó en la 1a. y 2a. transferencia, para la 3a. transferencia se observó el total de brotes y en la implantación se midió la interacción entre la concentración de las sales nutritivas y de la citocinina.

10.2. Enraizamiento.

Con 5 tubos como unidad experimental, se establecieron 6 categorías de evaluación por considerarse que dichos parámetros cumplían todos los posibles sucesos o pasos de la rizogénesis, de modo que se hicieron observaciones sobre el número de tubos que correspondía a cada categoría: u,w,v,x,y,z.

El tipo de concentración de auxina fué evaluada en base a la inducción de raíces.

Los resultados sobre las condiciones de incubación, es decir, los diferentes tipos de luz utilizada fueron -

hechos considerando la interacción con el nivel de auxinas.

10.3. Contaminación.

Fueron evaluados y contados los tubos que presentaron contaminación y utilizados también en los respectivos análisis de varianza para proliferación y enraizamiento y los datos se incluyeron en las categorías más bajas, es decir, D y U respectivamente. Sin embargo se presentan cuadro y gráfica sobre el porcentaje de cultivos asópticos para proliferación y enraizamiento.

11. Análisis de datos.

De cada una de las variables en estudio se obtuvieron las medias aritméticas y porcentajes y se presenta gráficamente, además de que se llevó a cabo un análisis de varianza y comparación de medias mediante la metodología estadística establecida.

RESULTADOS

1. PROLIFERACION:

Para estudiar el efecto sobre proliferación se consideraron las variables, número de brotes pequeños, número de brotes grandes y el total de brotes - en promedio que se obtuvieron.

De acuerdo al Análisis de Varianza practicado en los diferentes experimentos se encontró que hubo diferencias estadísticas significativas entre --- tratamientos, por lo que se procedió al cálculo del DMSH de Tukey al nivel del 5%.

1.1 EFECTOS DE LA CONCENTRACION DEL MEDIO.

En la comparación de medias sobre la variable número de brotes grandes -- (>1 cm) en la implantación inicial, de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey- se encontró que la concentración de las sales diluída al 75% presentó - una media de 2,83 que difiere de las 2 concentraciones más próximas - -- (100 y 50%); mientras que las variables, brotes pequeños y total de bro-- tes no difieren significativamente los tratamientos entre sí (cuadro 4).

En la gráfica 1 se visualiza que en la concentración del medio a 75% se - obtiene un mayor número de brotes en total y mayor número de brotes gran-- des, (>1 cm) no así con el número de brotes pequeños (<1 cm), siendo éste-- último mayor de 50% de la concentración del medio.

CUADRO 4. COMPARACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE NUMERO DE BROTOS OBTENIDO EN PROMEDIO DE ACUERDO A SU TAMAÑO NO DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO

(IMPLANTACION INICIAL)

CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALIS DEL MEDIO	NUMERO DE BROTOS PROMEDIO		
	PEQUEÑOS	1/ GRANDES	TOTAL 3/
100%	5.66 a	1.91 ab	7.58 a
75%	5.66 a	2.83 a	8.50 a
50%	5.75 a	1.00 ab	6.75 a
25%	4.83 a	0.33 b	5.16 a

VALORES CON LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES, DE ACUERDO CON LA PRUEBA DMSH DE TUKEY.

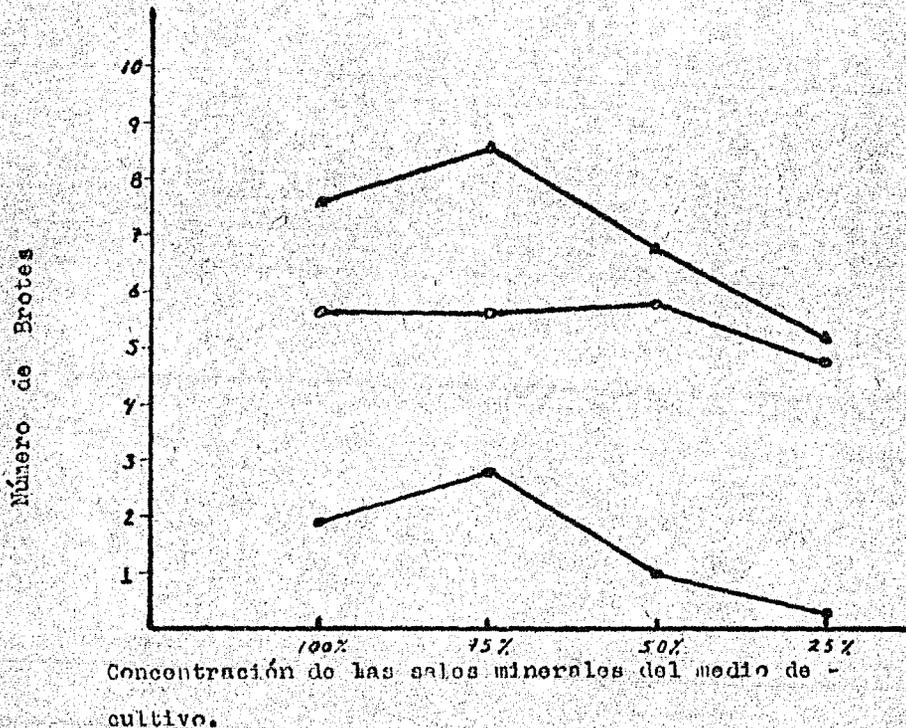
1/ $\alpha = 0.05 = 2.64$

2/ $\alpha = 0.05 = 2.30$

3/ $\alpha = 0.05 = 3.74$

GRAFICA 1. Efecto de la concentración de las sales minerales del medio sobre el número de brotes obtenidos de Limón - Mexicanos in vitro de acuerdo al tamaño.

BROTOS:
○ PEQUEÑOS
● GRANDES
△ TOTALES.



El caso de la primera y segunda transferencia, se analizaron en conjunto porque no fué considerado algún cambio significativo ya que muestran comportamientos semejantes. Puesto que a mayor concentración del medio se tiene mayor proliferación y viceversa (gráfica 2), el análisis estadístico se presenta en el cuadro 5 para que sea comprensible.

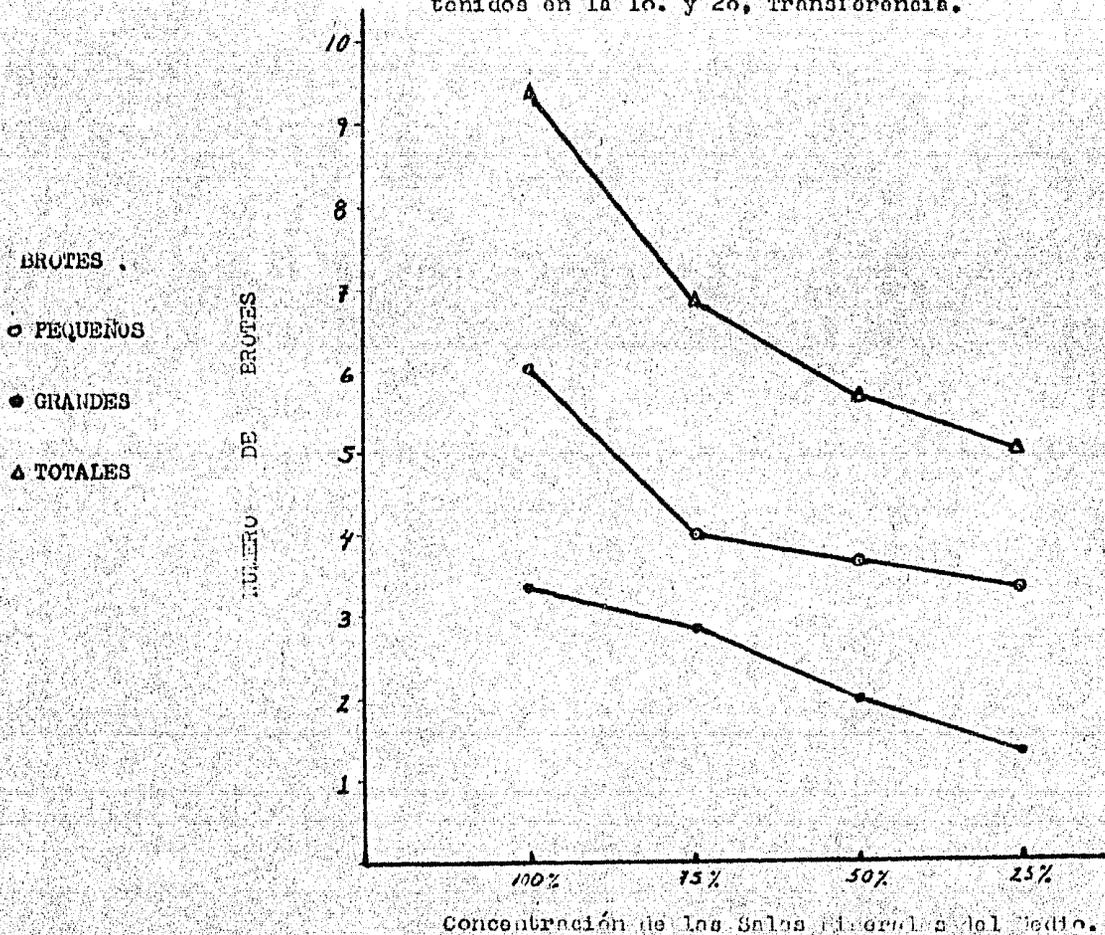
ESTIMACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE NUMERO DE BROTES - MEDIOS EN PROMEDIO DE ACUERDO A SU TAMAÑO, DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO DE CULTIVO (PARA LA 1a. y 2a. TRANSFERENCIA).

CONCENTRACION	NUMERO DE BROTES PROMEDIO		
	PEQUEÑOS <u>1/</u>	GRANDES <u>2/</u>	TOTAL <u>3/</u>
6.00 a	3.33 a	9.33 a	
4.00 a	2.83 a	6.83 ab	
3.66 a	2.00 a	5.66 ab	
3.33 a	1.67 a	5.00 b	

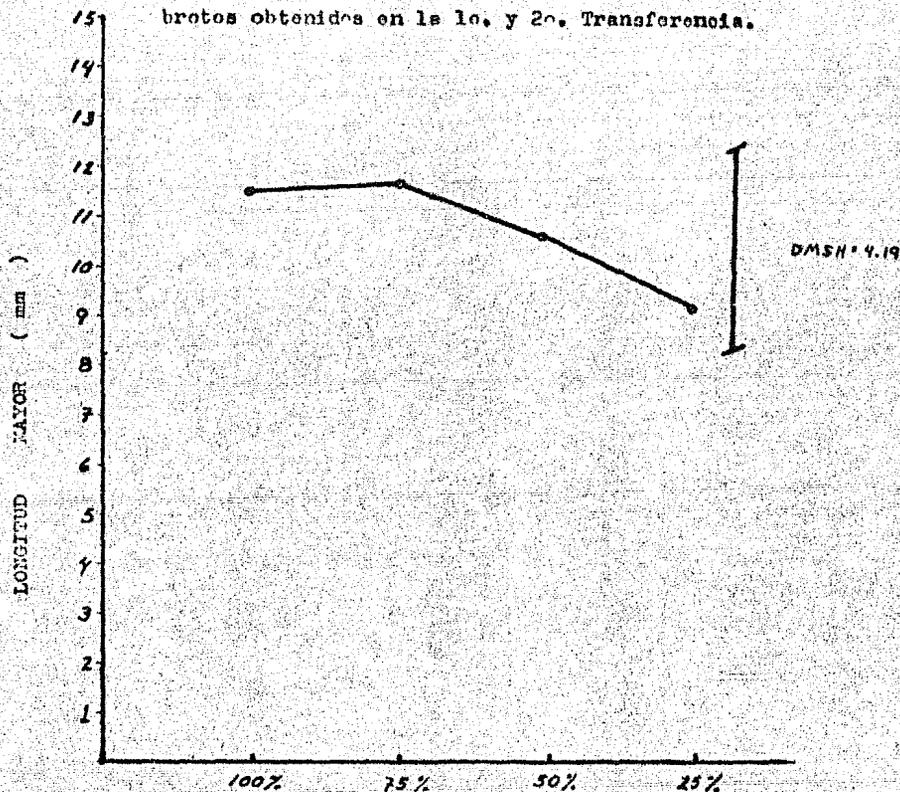
LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES DE ACUERDO A LA PRUEBA DE TUKEY,

2.83
2.17
3.92

GRAFICA 2.- Efecto de la concentración de las sales Minerales del Medio de Cultivo sobre el número de brotos obtenidos en la 1o. y 2o. Transferencia.



GRAFICA 3.- Efectos de la concentración de las sales minerales del medio de cultivo sobre la longitud mayor de los brotes obtenidos en la 1a. y 2a. Transferencia.



Concentración de las sales minerales del medio de cultivo.

De la misma forma se cuantificó y analizó la mayor longitud de los brotes obtenidos en la primer y segunda transferencia, es decir, de aquellos tratamientos que se consideraron cercanos al óptimo y con el fin de analizar no solo los efectos prolíficos, también el tamaño y/o longitud mayor de éstos brotes; así tenemos que al 75% de la concentración de las sales minerales del medio obtenemos la mayor longitud en mm, sin embargo ésta no difiere significativamente del resto de los tratamientos (cuadro 6); La gráfica muestra la tendencia de la curva de acuerdo a la concentración del medio y la longitud en mm de los brotes obtenidos.

CUADRO 6 COMPARACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE LONGITUD MAYOR DE BROTES OBTENIDOS DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO DE LA 1a. y 2a. TRANSFERENCIA.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO,	LONGITUD MAYOR MM
1	100%	11.50 a
2	75%	11.66 a
3	50%	10.66 a
4	25%	9.16 a

VALORES DE LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES

($\alpha = 0.05 = 4.19$) DE ACUERDO A LA PRUEBA DMSH DE TUKEY.

En este caso la comparación de medias para la variable número de brotes pequeños (≤ 1 cm) muestra diferencias significativas para el tratamiento en el cual se utiliza una concentración de 0.8 mg/l de B.A. con una media 6.66, siendo que las concentraciones de 0.6 y 1.0 mg/l tiene una media de 4.83 y 6.41 respectivamente sin presentar diferencia estadística altamente significativa (cuadro 7). De igual forma la gráfica 4 nos indica que el número total de brotes pequeños es mas alto a una concentración de 0.8 mg/l de BA, mientras que el número de brotes grandes (> 1 cm) es mayor a medida que disminuye la concentración de citocininas.

CUADRO 7 COMPARACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE NUMERO DE BROTES, DE ACUERDO A SU TAMAÑO Y DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE CITOCININAS.

(IMPLANTACION INICIAL)

CONCENTRACION CITOCININAS	PEQUEÑOS	NUMERO DE BROTES PROMEDIO		
		1/ GRANDES	2/ TOTAL	3/
0.4 mg/l	4.00 b	2.08 a	6.08 a	
0.6 mg/l	4.83 ab	1.50 a	6.33 a	
0.8 mg/l	6.66 a	1.25 a	7.91 a	
1.0 mg/l	6.41 b	1.25 a	7.66 a	

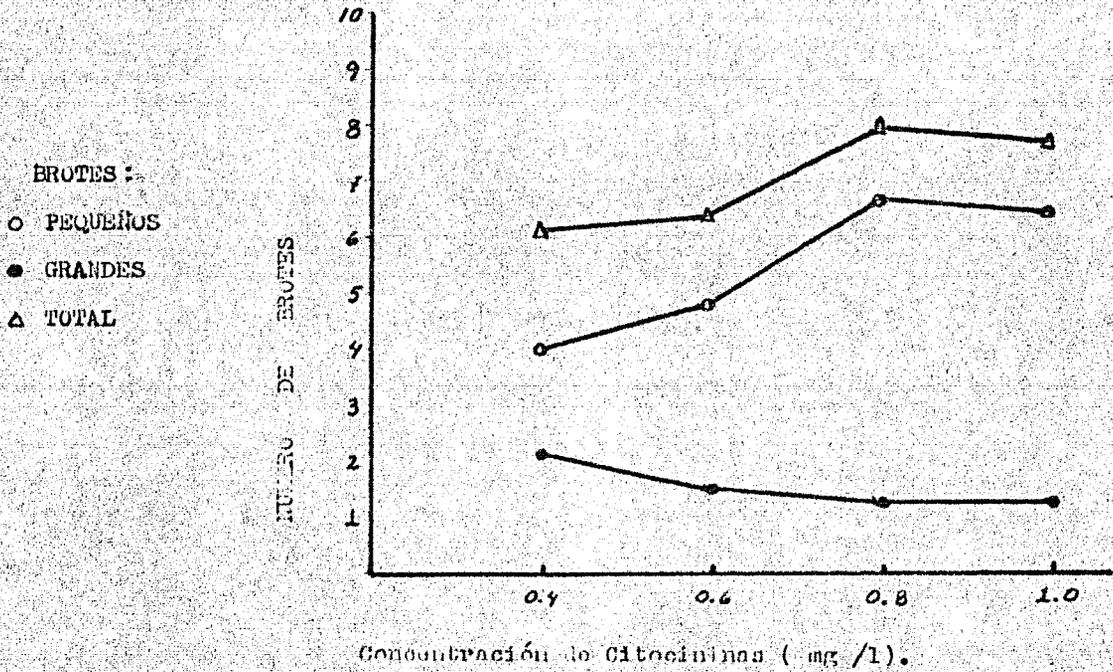
VALORES CON LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES DE ACUERDO CON LA PRUEBA DMSH DE TUKEY.

$$1/ \alpha = 0,05 = 2,64$$

$$2/ \alpha = 0,05 = 2,30$$

$$3/ \alpha = 0,05 = 3,74$$

GRAFICA 1.- Efecto de la concentración de Citocininas sobre el número de brotes obtenidos de Limón Mexicano In Vitro de acuerdo al tamaño. (Implantación).



Asimismo sobre la 1a, y 2a. transferencia, en donde se hizo un análisis conjunto, fueron evaluados el número y tamaño promedio de los brotes obtenidos.

La concentración de 0.8 mg/l de BA dió mayor número de brotes en todos los tamaños (gráfica 5) y con ello mejorando el promedio de los brotes grandes, como puede ser observado en el cuadro 8 que muestra un comportamiento diferencial para los brotes pequeños y el total de éstos con la concentración de citocinas a 0.8 mg/l.

CUADRO 8. COMPARACION DE MEDIAS PARA VARIABLE NUMERO DE BROTES OBTENIDOS EN PROMEDIO DE ACUERDO A SU TAMAÑO DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE CITOCININAS (PARA LA 1a. y 2a. TRANSFERENCIA).

CONCENTRACION CITOCININAS <i>mg/l</i>	PEQUEÑOS	NUMERO DE BROTES PROMEDIO		
		1/	2/	TOTAL 3/
0.6	2.62 b	1.50 a	4.12 b	
0.8	5.75 a	3.12 a	9.87 a	
1.0	4.37 ab	1.75 a	6.12 b	

VALORES CON LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES DE ACUERDO CON LA PRUEBA DMSH DE TUKEY

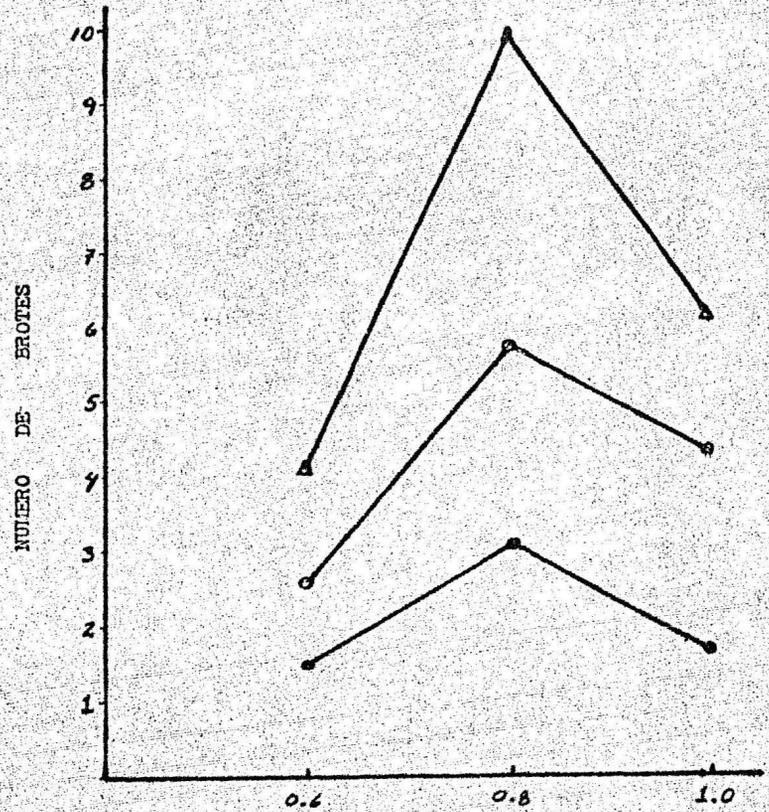
$$1/ \alpha = 0.05 = 2.24$$

$$2/ \alpha = 0.05 = 1.96$$

$$3/ \alpha = 0.05 = 3.04$$

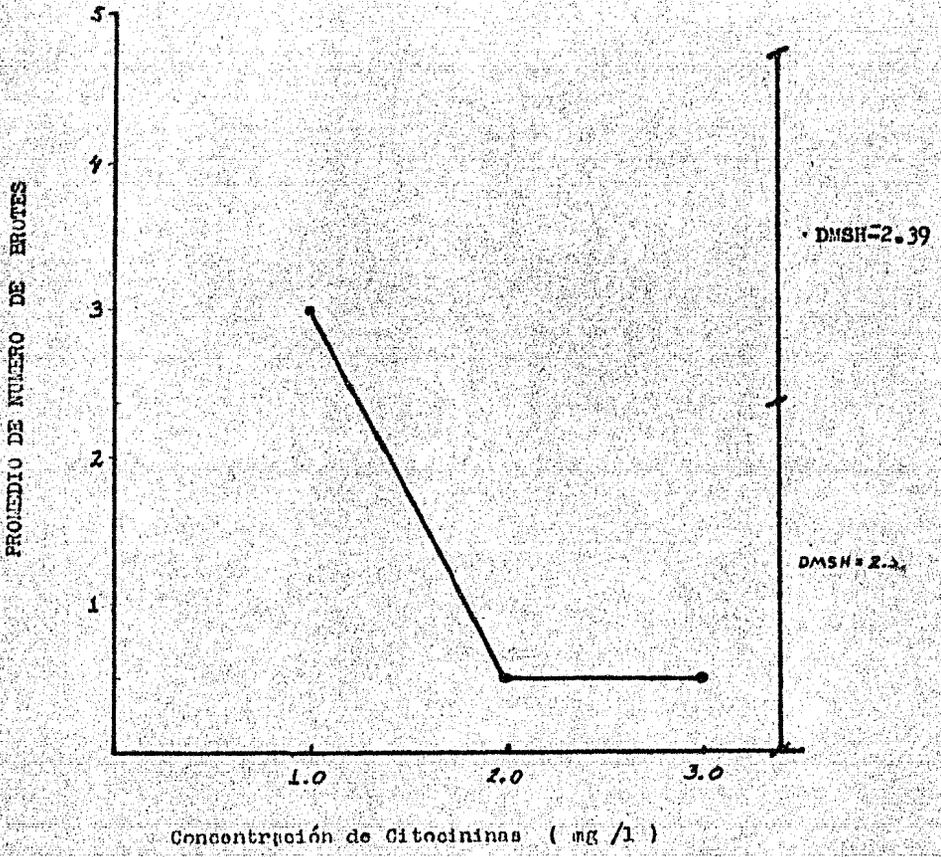
GRAFICA 5.- Efecto de la Concentración de Citocininas sobre el número de brotes en la 1o. y 2o. Transferencia

BROTOS :
○ PEQUEÑOS
● GRANDES
△ TOTALES



Concentración de Citocininas

GRAFICA 6.- Efecto de la concentración de Citocininas sobre el número de brotes obtenidos de Limón Mexicano In Vitro 3a Transferencia



Se evaluó de la misma forma, una mayor concentración de cito-
 cininas en la tercera transferencia, en donde se manejaban
 1.0, 2.0 y, 3.0 mg/l de BA y se obtuvo un fuerte decremento -
 estadísticamente significativo, es decir, lejos de favorecer
 la proliferación, la inhibió. (cuadro 9).

El tipo de brotes obtenidos fué de tamaño pequeño y la media
 respecto a su número fué 3 en el mejor de los casos, que di-
 fiere mucho de los obtenidos en la implantación inicial --
 (gráfica 4), pero se debe considerar que se tomaron éstos
 brotes para ser transferidos 4 semanas después, por lo que;
 a igual concentración de citocininas (1.0 mg/l de BA) se --
 obtuvo un resultado diferente y menor en un 50% (gráfica 6)

CUADRO 9. COMPARACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE NUMERO DE BRO-
 TES DEPENDIENDO DE UNA CONCENTRACION MAYOR DE CITO-
 CININAS (3a. TRANSFERENCIA).

CONCENTRACION DE CITOCININAS	PROMEDIO	NUMERO DE BROTES OBTENIDOS SIGNIFICANCIA
1.0 mg/l	3.00	a
2.0 mg/l	0.50	b
3.0 mg/l	0.50	b

VALORES CON LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES DE -
 ACUERDO CON LA PRUEBA DMSH DE TUKEY.

($\alpha = 0.05 = 2.39$)

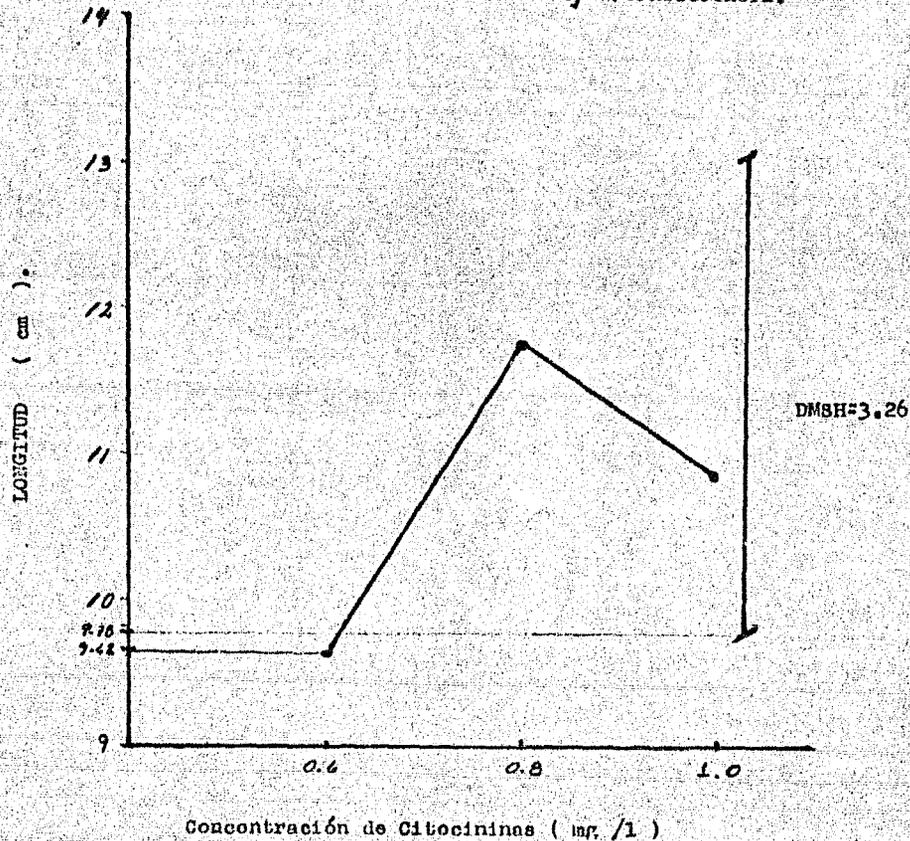
De acuerdo al rango de concentraciones de citocininas mas adecuadas (0.6, 0.8 y 1.0 mg/l de BA) se midió la longitud mayor de los brotes obtenidos y el resultado s, tuvo diferencia significativa estadística, oscilando estos - - promedios con relación a las citocininas en 9.62, 11.75- y 10.87 mm respectivamente, es decir, nuevamente una con centración de 0.8 mg/l de BA reportó los mejores resull tados. (Cuadro 10 y Gráfica 7).

CUADRO 10. COMPARACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE LONGITUD MAYOR DE BROTES OBTENIDOS DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE CITOCININAS EN LA 1a. Y 2a. TRANSFERENCIA.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION CITOCININAS	LONGITUD MAYOR (mm)
1	0.6 mg/l	9.62 a
2	0.8 mg/l	11.75 b
3	1.0 mg/l	10.87 b

VALORES CON LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES ($\alpha = 0.05 = 3.26$ DE ACUERDO A LA PRUEBA DMSH DE TUKEY).

GRAFICA 7.- Efecto de la Concentración de Citocininas sobre la Longitud mayor de brotes obtenidos en la 1a.y 2a. Transferencia.



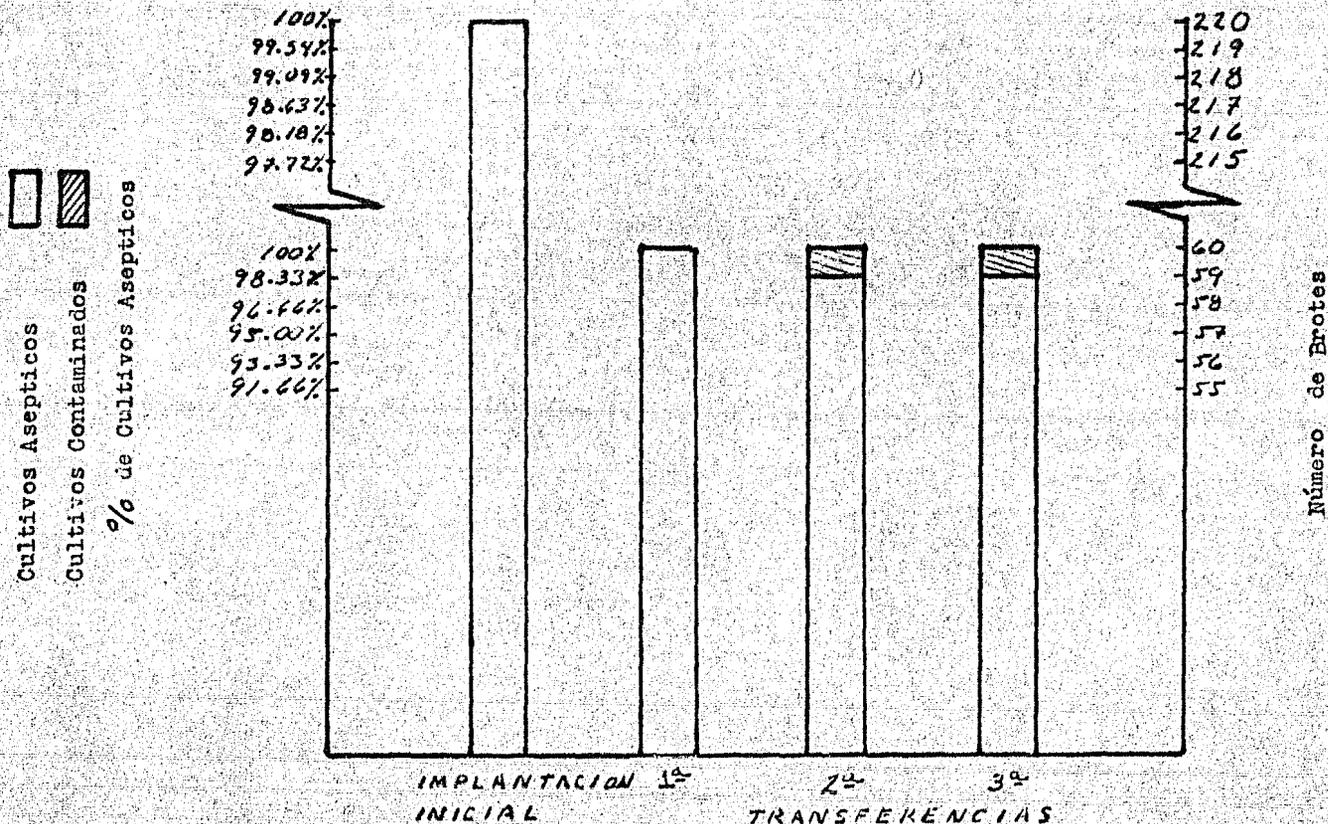
1.3. CONTAMINACION.

Los tubos que presentaron contaminación fueron simplemente contados para después hacer una evaluación general de la asepsia en la metodología empleada. De esta forma se presenta el cuadro 11 que muestra un reducido número de tubos contaminados, razón por la cual se incluyeron en la última categoría de proliferación para hacer el análisis de varianza (Gráfica 8).

CUADRO 11 EVALUACION DE LA CONTAMINACION EN LAS ETAPAS DE PROLIFERACION CONSIDERANDO EL NUMERO DE TUBOS EMPLEADOS, LOS CONTAMINADOS Y EL PORCENTAJE DE ASEPSIA.

ETAPAS	NUM.DE TUBOS EVALUADOS	NUM.DE TUBOS CONTAMINADOS	PORCENTAJE DE ASEPSIA
Implantación	220	0	100%
1a. Transferencia	60	0	100%
2a. Transferencia	60	1	98.33%
3a. Transferencia	60	1	98.33%

GRAFICA 8.- Porcentaje de Cultivos Asepticos y Contaminados para la parte de proliferación en sus etapas de Implantación y Transferencias.



2. ENRAIZAMIENTO.

En el caso de los ensayos experimentales solo se efectuó un análisis porcentual de los resultados y éstos se enmarcan en los incisos correspondientes; para el esquema final en donde se plantearon variaciones en la concentración de auxinas, condiciones de incubación y tiempo de permanencia en el medio.

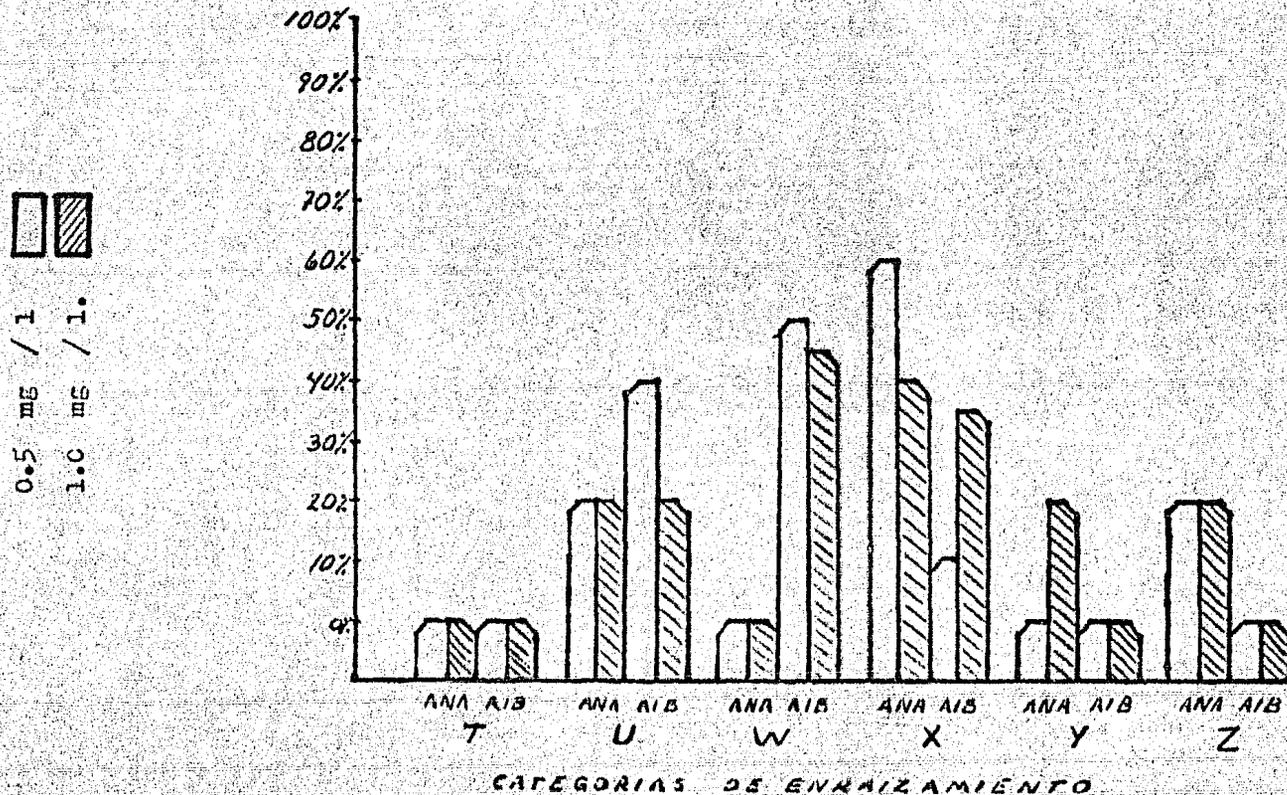
2.1. EFECTO DEL TIPO Y CONCENTRACION DE AUXINA.

Fue el Acido Naftalenacético (ANA) la auxina más empleada, sin embargo fue probada también el Acido Indolbutírico (AIB) con el propósito de hacer una comparación en sus efectos y para lo cual se hizo una evaluación porcentual, utilizando 2 concentraciones para ANA y AIB (Cuadro 12). De esta forma la Gráfica 9 sirve para hacer la comparación visual y en donde puede observarse la diferencia en efectos con una y otra auxina.

CUADRO 12. EVALUACION PROCENTUAL DE LAS AUXINAS ANA Y AIB EN DOS CONCENTRACIONES, SOBRE LAS CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO. DATOS CORRESPONDIENTES AL 2o.y 3er. ENSAYO.

AUXINA	CONCENTRACION mg/l	CATEGORIAS						DE ENRAIZAMIENTO TOTAL
		T	U	W	X	Y	Z	
ANA	0.5	0	20	0	60	0	20	100%
ANA	1.0	0	20	0	40	20	20	100%
AIB	0.5	0	40	50	10	0	0	100%
AIB	1.0	0	20	45	35	0	0	100%

GRAFICA 9.- Evaluación Porcentual de las Auxinas ANA y AIB e
 en dos concentraciones sobre las categorías de --
 enraizamiento. Datos correspondientes al 2o. y 3o.
 ensayo.



2.2 EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION

Con respecto a éste parámetro fueron evaluadas diferentes condiciones, en donde se realizaron ensayos preliminares con el fin de reducir la amplitud de las variables estudiadas y definir un esquema final de enraizamiento.

Se empezó por variar la concentración hormonal de Acido Naftalen-Acético (ANA) con 0.5 y 1.0 mg/l y 2 condiciones de incubación: cuatro semanas en el mismo medio con auxinas y 2 semanas en un medio libre de éstas (Cuadro 13); Para efectos de evaluación se hizo un análisis porcentual basado en la comparación entre una y otra condición (Gráfica 10)

CUADRO 13 ANALISIS PORCENTUAL DE DOS DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LAS CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO. DATOS CORRESPONDIENTES AL 1er. SENSAYO.

CONDICIONES DE INCUBACION.	CONCENTRACION mg/l ANA	CATEGORIAS DE EVALUACION						TOTAL
		T	U	W	X	Y	Z	
4 semanas medios con auxinas. (I)	0.5	0	40	0	60	0	0	100%
	1.0	0	20	0	80	0	0	100%
2 semanas con auxinas y 2 semanas sin éstas. (II)	0.5	0	0	0	20	0	80	100%
	1.0	0	0	0	20	0	80	100%

*/ T,U,W,X,Y,Z, = CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO

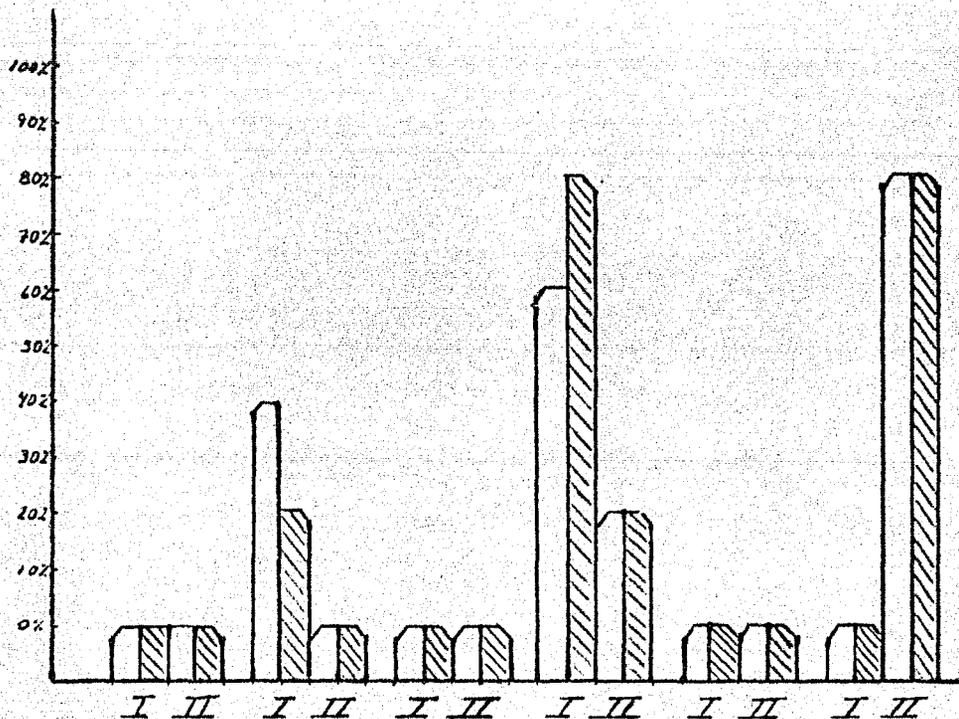
0.5 mg/l
1.0 mg/l

Condiciones de Incubación:

I Cuatro semanas medio con Auxinas

II Dos semanas con Auxinas y dos sin Auxinas

GRAFICA 10.- Analisis Porcentual de dos diferentes condiciones de incubación sobre las categorías de enraizamiento. Datos correspondientes al lo Ensayo.



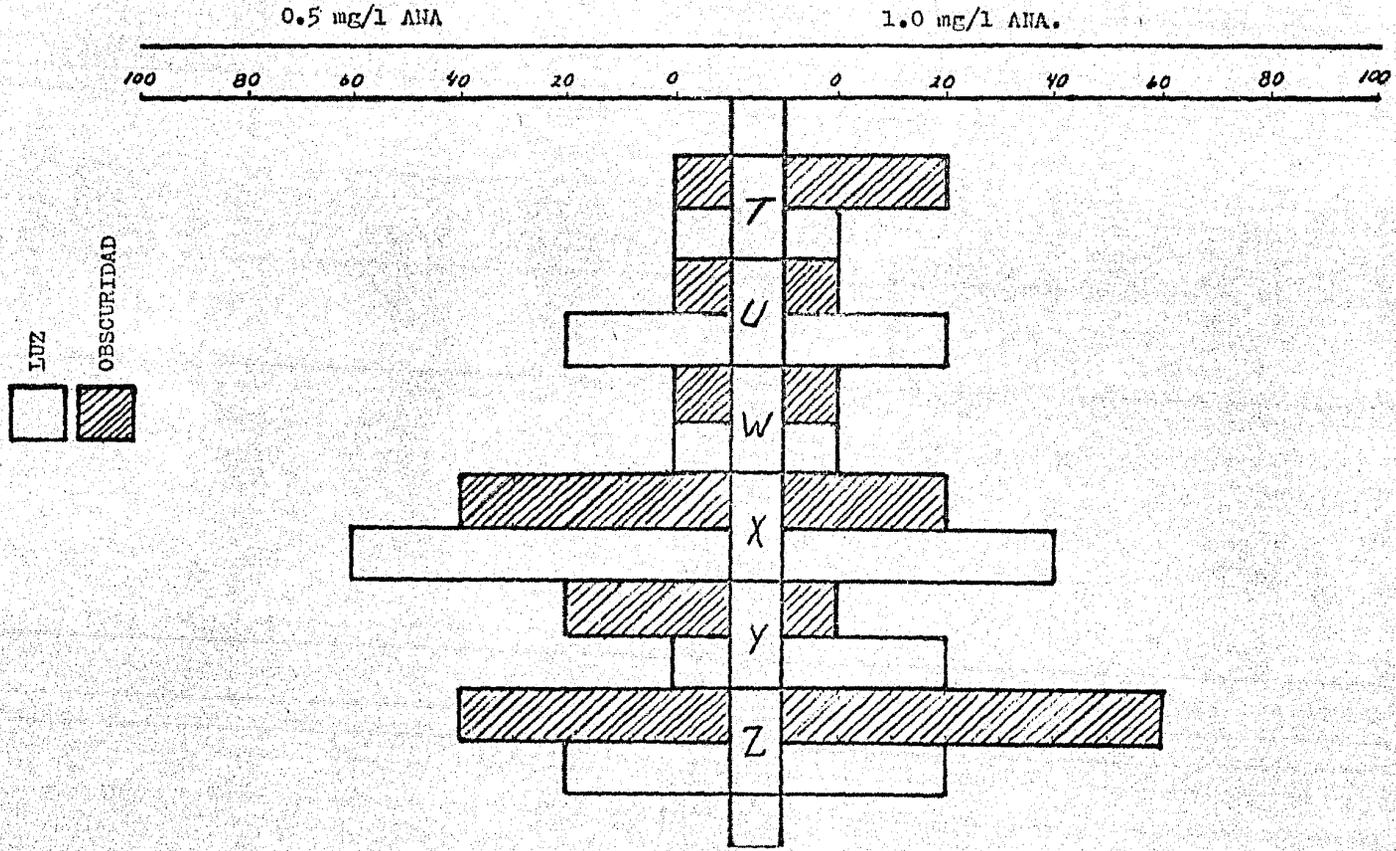
Con el objeto de evaluar el efecto de la obscuridad sobre el enraizamiento se planteo manejar dos concentraciones de ANA (0.5 y 1.0 mg/l) y subdividir las a manera de colocar la mitad de tubos en completa obscuridad para ambas concentraciones y el resto incubarlos bajo luz, para posteriormente ser transferidos todos los tubos a un medio sin hormonas y bajo luz 16 hrs. (Gráfica 11). Los resultados, de la misma forma que en los demás ensayos preliminares, fueron cultivados con un análisis porcentual respecto al comportamiento de las condiciones de luz y obscuridad sobre enraizamiento (Cuadro 14).

CUADRO 14. EVALUACIONES EN BASE A UN ANALISIS PORCENTUAL DE 2 - CONDICIONES DE ENRAIZAMIENTO, DATOS CORRESPONDIENTES AL 2o. ENSAYO.

CONDICIONES DE INCUBACION	CONCENTRACION DE mg/l ANA	CATEGORIAS DE EVALUACION						TOTAL
		T	U	W	X	Y	Z	
Bajo Luz 16 hrs	0.5	0	20	0	60	0	20	100 %
	1.0	0	20	0	40	20	20	100 %
Completa	0.5	0	0	0	40	20	40	100 %
Obscuridad	1.0	20	0	0	20	0	60	100 %

*/ T,U,W,X,Y,Z = CATEGORIAS DE ENRAIZAMIENTO.

GRAFICA 11.- Analisis Porcentual respecto al comportamiento de dos concentraciones Auxinas y dos condiciones de Incubación sobre las categorías de enraizamiento.



En el esquema final de enraizamiento se condujo la evaluación de tres concentraciones auxínicas más altas que las probadas anteriormente, junto con tres condiciones de luz; es decir tres concentraciones de ABA ($5 \mu\text{M}$ - 0.931 mg/l; $10 \mu\text{M}$ = 1.862 mg/l; $15 \mu\text{M}$ = 2.793 mg/l) y las condiciones de luz fueron blanca y roja (12 hrs.) y completa oscuridad por un período de cuatro semanas para después ser transferidas a un medio sin reguladores de crecimiento y permanecer bajo las mismas condiciones de luz.

De esta forma el análisis de varianza fué desarrollado sobre los efectos producidos en el enraizamiento - después de ocho semanas de tratamiento (cuadro 15).

CUADRO 15. ANALISIS PORCENTUAL DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS SOBRE LAS VARIABLES DE ENRAIZAMIENTO DE PLANTAS SOMETIDAS A 3 CONDICIONES DE LUZ, DESPUES DE 8 SEMANAS. DATOS CORRESPONDIENTES A LA 1a. FASE.

VARIABLES	CONDICIONES DE LUZ	PORCENTAJE POR CADA TIPO DE LUZ
Sin Cambio aparente	Blanca	3.33
	Roja	0.0
	Oscuridad	0.0
Engrosamiento base	Blanca	0.0
	Roja	23.33
	Oscuridad	33.33
Iniciación de Callo	Blanca	26.66
	Roja	16.66
	Oscuridad	23.33
Callo desarrollado	Blanca	36.66
	Roja	40.00
	Oscuridad	33.33
Primordio de raíz	Blanca	0.0
	Roja	0.0
	Oscuridad	0.0
Raíz desarrollada	Blanca	10.0
	Roja	10.00
	Oscuridad	13.33

Asimismo, se efectuó el análisis de varianza de la interacción existente entre los medios de cultivo (con auxinas y libres de éstas) sobre la variable de mayor interés, esta es, el número - de plantas con raíces ya desarrolladas, (Cuadro 16).

CUADRO 16. INTERACCION EXISTENTE ENTRE LOS MEDIOS QUE CONTENIAN TRES CONCENTRACIONES AXINICAS (ANA) Y EL EFECTO AL SER TRANSFERIDOS A UN MEDIO LIBRE DE REGULADORES SOBRE LA VARIABLE, NUMERO DE PLANTAS CON RAICES YA DESARROLLADAS.

COMPARACION ENTRE MEDIOS	LIMITE INFERIOR	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	LIMITE SUPERIOR	SIGNIFICANCIA.
9-1	0.00298	0.55556	1.10813	***
9-2	0.00298	0.55556	1.10813	***
9-3	0.00298	0.55556	1.10813	***
1-9	1.10813	0.55556	0.00298	***
2-9	1.10813	0.55556	0.00298	***
3-9	1.10813	0.55556	0.00298	***

VALORES CON LA MISMA MARCA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES, DE ACUERDO CON LA PRUEBA DMST DE TUKEY.

ALFA	=	0.05	=	3.9
MEDIO	1 =	5 µM	=	0.931 mg/l
MEDIO	2 =	10 µM	=	1.862 mg/l
MEDIO	3 =	15 µM	=	2.793 mg/l
MEDIO	9 =	SIN AUXINAS		

*** : SIGNIFICATIVO AL 0.05 %

En la segunda fase del experimento, en donde se mantuvieron durante dos semanas bajo tres diferentes condiciones de luz 12 hrs.

Y dos más, bajo luz roja continua en un medio con tres diferentes concentraciones auxínicas y después fueron transferidas a un medio sin reguladores y bajo luz roja con un fotoperíodo de 12 hrs luz (Cuadro 17).

CUADRO 17. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS SOBRE LAS VARIABLES DE ENRAIZAMIENTO DE PLANTAS PROCEDENTES DE MEDIOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES AUXINICAS Y DESPUES DE 8 SEMANAS. DATOS CORRESPONDIENTES A LA 2a. FASE.

VARIABLE	MEDIO AUXINICO (μ M)	PORCENTAJE POR CADA CONCENTRACION	PROMEDIO CON EL TOTAL DE TUBOS	SIGNIFICANCIA DEL PROMEDIO.
ENGROSAMIENTO BASE	5	6.66	0.33	a
	10	3.33	0.16	a
	15	10.00	0.50	a
INICIACION DE CALLO	5	46.66	2.33	a
	10	16.66	0.83	b
	15	13.33	0.66	b
CALLO DESARROLLADO	5	33.33	1.50	b
	10	63.33	3.33	a
	15	46.66	2.33	a b
RAIZ DESARROLLADA	5	13.33	0.66	a
	10	16.66	0.83	a
	15	30.00	1.33	a

VALORES CON LA MISMA LETRA SON ESTADISTICAMENTE IGUALES, DE ACUERDO CON LA PRUEBA DMSE DE TUKEY.

ALFA = 0.05 = 3.67

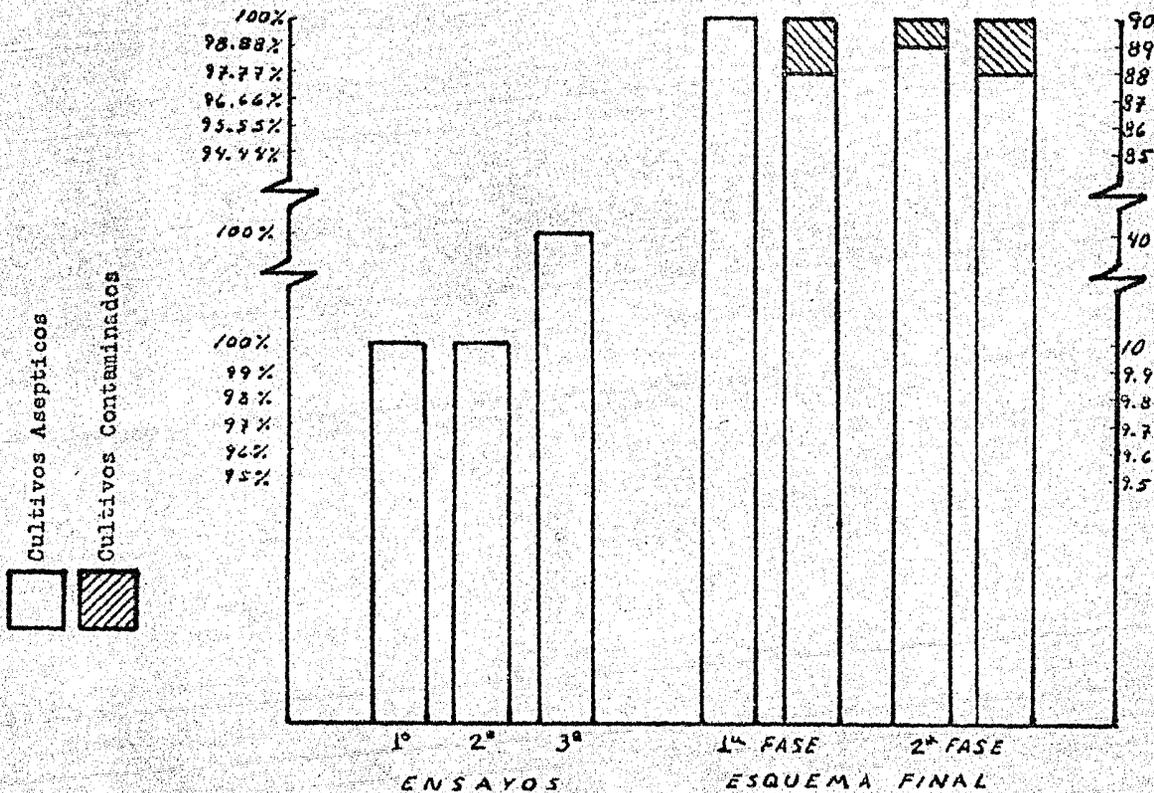
2.3 CONTAMINACION

Este parámetro fue evaluado, como ya se dijo, en base a porcentaje de cultivos asepticos, para lo cual se contabilizó, en número de tubos que presentaban contaminación, lo cual se muestra en el cuadro 18. Para hacer el análisis estadístico de éstos tubos, fueron incluidos en la última categoría de evaluación para enraizamiento (Gráfica 12).

CUADRO 18. EVALUACION DE LA CONTAMINACION EN LAS ETAPAS DE ENRAIZAMIENTO CONSIDERANDO EL NUMERO DE TUBOS EMPLEADOS, LOS CONTAMINADOS Y EL PORCENTAJE DE ASEPSIA.

ETAPAS	Núm.de Tubos Evaluados	Núm. de Tubos Contaminados	Porcentaje de Asepsia.
1er. ENSAYO	10	0	100 %
2do. ENSAYO	10	0	100 %
3er. Ensayo	40	0	100 %
ESQUEMA FINAL			
1a. FASE			
c/ Auxinas	90	0	100%
s/ Auxina	90	2	97.77 %
2a. FASE			
C/ Auxinas	90	1	98.88 %
s/ Auxinas	90	2	97.77 %

GRAFICA 12.- Porcentaje de Cultivos Asepticos y Contaminados para la parte de enraizamiento en sus ensayos.- y al esquema final



DISCUSION

1. PROLIFERACION:

En la base de los resultados obtenidos se observa; que la concentración de sales minerales del medio de cultivo que dió mejor resultado para efectos de proliferación varió de acuerdo al tiempo de permanencia en el medio, es decir, para la implantación inicial con la dilución de sales al 75 % se obtuvo un total de brotes promedio mayor que con cualquiera de las otras concentraciones - probadas aunque no difieren significativamente una de otra, sin embargo, para el número de brotes grandes si hubo diferencia estadística significativa al 75 % de la concentración del medio. Existe una tendencia diferente al analizar los datos de la primera y segunda transferencia, en donde con una concentración del 100 % se obtuvieron un total de brotes promedio mayor y estadísticamente significativo del resto de las concentraciones evaluadas, sin existir tal diferencia para el número de brotes pequeños y/o grandes.

Los resultados encontrados difieren con lo obtenido por Villegas (1982), quien indica que existe una diferencia significativa - estadística favorable al utilizar una concentración del 50 % en el medio, a diferencia del 100 % para lograr mayor formación de brotes existiendo además esta diferencia al evaluar diferentes - cultivares en interacción con el medio de cultivo.

En cuanto al tamaño y/o longitud de los brotes obtenidos, el análisis de varianza no muestra diferencias estadísticas significativas dependiendo de la concentración del medio, sin embargo, --

en la dilución del medio al 75 % se obtiene una longitud promedio mayor de los brotes; de la misma forma Pizarro (1983) propone que la concentración de las sales minerales del medio de cultivo no tiene respuesta significativa en el desarrollo de brotes y si existe tal diferencia en la interacción de material vegetativo-medio de cultivo sobre la variable desarrollo de brotes por lo que se piensa que las diferencias no están en la concentración del medio de cultivo, sino que probablemente se deben a la edad y procedencia del material vegetativo.

El análisis estadístico sobre la concentración de citocininas indica que con 0.8 mg/l de BA se obtiene un mayor número de brotes totales en promedio, apareciendo una diferencia estadísticamente significativa solo en el caso de la primera y segunda transferencia, pero en la implantación inicial existe esta significancia en el número de brotes pequeños, no así para el total de brotes obtenidos en donde se obtiene un promedio mayor y no diferente estadísticamente; la peculiaridad del asunto consiste en que el número de brotes grandes aumenta conforme disminuye la concentración de citocininas, sin embargo, no existe diferencia significativa; resultado que *concorda con lo* expuesto por Chaturvedi y Mitra (1974 b).

De la misma forma se evaluó una mayor concentración de citocininas en la tercera transferencia, en donde se manejaban 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l de BA y se obtuvo un fuerte decremento, estadísticamente significativo, cuando se incrementaba la concentración, es decir, lejos de favorecer la proliferación, la inhibió a pesar de que se utilizó una concentración ya evaluada de --

(1.0 mg/l de BA) en la implantación inicial y que el resultado difiere en un 50% menos; ello pudo deberse al tiempo de permanencia en el medio, antes de hacer la tercera transferencia -- (cuatro semanas más). De esta manera se observa como afecta - en forma desfavorable un mayor tiempo de permanencia en el medio. Estos resultados son *semejantes* a los observados por Shoog y Armstrong (1970); Grinblat (1972); Barlas y Skene (1982) quienes con diferentes especies de Citrus mostraron que existe una variación en su habilidad para regenerar plantulas In Vitro como una función de origen y madurez del explante, es decir, dependiendo de la especie, edad, posición y época de año.

El rango de concentraciones de citocininas más adecuadas (0.6. 0.8 y 1.0 mg/l de BA) fueron probadas para determinar aquella con la cual se obtiene una longitud mayor que brotes y aunque - no existió diferencia estadística significativa, fué nuevamente la concentración de 0.8 mg/l en donde se obtuvo una longitud ma yor, es decir 11.75 mm. que difiere con Raj y Arya (1978) aunque no se menciona si existe diferencia estadística significativa.

En relación con la contaminación, la evaluación fué hecha en base a la relación del número de tubos contaminados y evaluados - para obtener el porcentaje de asepsia, es decir de 400 tubos -- evaluados, dos presentaron contaminación, lo que equivale a un 99.5 % de cultivos asépticos, con lo cual puede decirse que la - metodología empleada es adecuada.

2. ENRAIZAMIENTO.

De acuerdo al tipo de auxina probada, fué el ácido Naftalenacético (ANA) con la que se obtuvo un mejor resultado que el Acido Indolbutírico (AIB) sobre la formación de callo, primordio de raíz y raíces desarrolladas, ello en concordancia con Chaturvedi

y Mitra (1974-A), Barlas y Skene (1982) quienes también aseguran es el ANA la auxina de mayor efecto sobre el enraizamiento de Citrus cultivados in vitro.

La concentración auxínica probada en los ensayos experimentales para enraizamiento fué de 0.5 y 1.0 mg/l, tal como lo reportan Raj y Arya (1978), Grinblat (1972), Altman y Goren (1977), Chaturvedi y Mitra (1974-A) y por tal razón fueron evaluadas primeramente ambas concentraciones. Se obtuvo un enraizamiento del 20% en condiciones normales y un máximo de 80% al encontrarse en obscuridad o ser transferida a un medio libre de auxinas, por ello se pensó en aumentar la concentración de auxina para elevar los resultados y de ésta forma se utilizó 5, 10 y 15 μ M de ANA (0.93, 1.86 y 2.79 mg/l) en concordancia con Gorst et al. (1981), Plumer y Fossard (1981), Barlas y Skene (1982), con lo que se obtuvo un enraizamiento mínimo de 13.33% y un máximo de 30%.

Con respecto al tiempo de permanencia en el medio auxínico, el análisis de varianza indica que si existe diferencia estadística altamente significativa al comparar el establecimiento en un medio conteniendo auxinas por espacio de cuatro semanas y transferir las plantulas a un medio libre de ellas para permanecer un tiempo de cuatro semanas más y evaluar el efecto sobre la variable número de plantas con raíces ya desarrolladas; sin embargo con los resultados del primer ensayo parece ser de mayor efecto en enraizamiento el hecho de mantener por espacio de dos semanas los implantes en un medio conteniendo auxinas y dos semanas más sin éstas. Lo cual refleja similitud con lo ---

reportado por Navatel (1982), quién manifiesta que las plántulas deben acondicionarse en un medio libre de reguladores, para ser transferidas a un medio con auxinas y el efecto sea mayor al pasarlas nuevamente a un medio libre de auxinas.

El fotoperíodo, así como el tipo de color de luz emitida fueron otras dos condiciones de incubación estudiadas en conjunto en donde se probó el efecto de: a) 16 hrs luz Blanca y 24 hrs obscuridad, b) Luz blanca y roja 12 hrs y 24 hrs de obscuridad, c) Luz blanca, roja y obscuridad 12 hrs (dos semanas) y 12 hrs de luz roja (dos semanas), en los diferentes experimentos desarrollados y después de cuatro semanas los tubos fueron colocados en 16 hrs luz blanca y roja, y 24 hrs de obscuridad y 12 hrs luz roja, respectivamente, para hacer observaciones de evaluación un mes más tarde. Ello dió por resultado mejores efectos sobre el enraizamiento al mantener las plantas en completa obscuridad (24 hrs) y al transferirlas al medio sin auxinas y proporcionarles luz blanca con un fotoperíodo de 16 hrs. Lo que concuerda con Druart et al, (1982) quienes encontraron que con el efecto de la obscuridad-obscuridad (24 hrs) es mayor el porcentaje de enraizamiento, lo que indica que la obscuridad favorece la formación de raíces en forma superior durante la fase de iniciación que durante la inducción.

Para finalizar, los experimentos desarrollados en las etapas de enraizamiento resultaron con un porcentaje mínimo de contaminación, pues de 420 tubos evaluados en total, el número de tubos contaminados fué de 5, lo que corresponde a un porcentaje de asepsia de 98.81% con lo que resulta ser aceptable la metodología empleada para obtener reducido número de tubos contaminados.

CONCLUSIONES

- La Concentración de sales minerales del medio de cultivo más adecuado para efectos de proliferación fué 75% en la im-plantación inicial y 100% para la 1a. y 2a. transferencia.
- La concentración de Citocininas con la cual se obtuvo un ma-yor número de brotes promedio y longitud, fué 0.8 mg/l de BA, decreciendo fuertemente el promedio de brotes obtenidos con-forme se incrementa la concentración de citocininas a 2 y 3-
mg/l.
- Un mayor tiempo de permanencia en el medio de cultivo afecta desfavorablemente la proliferación de brotes decreciendo el-promedio de brotes obtenidos hasta en un 50%.
- El Acido Naftalenacético fué la auxina con la cual se obtu-
vieron los mejores resultados sobre la formación de callos, -
primordios de raíz y raíces completamente desarrolladas.
- Las concentraciones auxínicas de 0.5 y 1.0 mg/l dieron por -
resultado un 80% al ser transferidos a un medio sin auxinas, mientras que en las concentraciones más altas de ANA como 5, 10 y 15 μ M (0.93, 1.86 y 2.79 mg/l) se obtuvo un enraizamien-
to máximo de 30 %.
- Los mejores resultados con respecto al tiempo de permanencia en un medio auxínico, se obtuvieron al colocarlas por espacio de 2 semanas en un medio conteniendo auxinas y transferirlas a un medio libre de éstas.
- La permanencia en la obscuridad completa (24 hrs) por espacio de 4 semanas permitió incrementar al máximo el porcentaje de enraizamiento cuando fueron transferidas a un medio libre de reguladores y permanecer las plantas con un fotoperíodo de -
16 hrs de luz blanca.

A P E N D I C E

CUADRO 1.A.- SOLUCIONES CONCENTRADAS DE LAS SALES
INORGANICAS DEL MEDIO MODIFICADO DE
MUFASHIGUE Y SKOOG (1962).

I. NITRATOS	g/l
Nitrato de Amonio (NH y NO_3)	165.00
Nitrato de Potasio (KNO_3)	190.00
II. SULFATOS	
Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.00
Sulfato de Manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.690
Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.860
Sulfato Cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{SH}_2\text{O}$)	0.0025
III. HALOGENOS	
Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	44.00
Ioduro de Potasio (KI)	0.083
Cloruro de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
IV. PO_4 , BO_3 , MOO_4	
Fosfato de Potasio ($\text{KH}_2 \text{PO}_4$)	17.00
Acido Bórico ($\text{H}_3 \text{BO}_4$)	0.620
Molibdato de Sodio ($\text{NaMOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.025
V. NaFeEDTA	
Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.784
Acido Etilendinitrilotetra-Acetato (NaEDTA)	3.724

CUADRO 2A.- SIGNIFICANCIA DE LAS PRUEBAS DE F. PARA
CADA VARIABLE DE ESTUDIO EN LA 1a. FASE
DEL ESQUEMA FINAL DE ENRAIZAMIENTO.

VARIABLE	FACTORES DE VARIACION			
	AUXINAS	LUZ	AUX.-LUZ	C.V.
SIN CAMBIO APARENTE	NS	NS	NS	280.62
ENGROSAMIENTO BASE	NS	NS	NS	58.56
INICIA CALLO	NS	NS	NS	98.85
CALLO DESARROLLADO	NS	NS	NS	63.58
PRIMODIO DE RAIZ	NS	NS	***	519.61
RAIZ DESARROLLADA	***	NS	NS	152.97

N.S. = No Significativo

*** = Significancia al 0.05

C.V. = Coeficiente de Variación

CUADRO 3A. - SIGNIFICANCIA EN LAS PRUEBAS DE F. PARA CADA VARIANTE DE ESTUDIO EN LA 2a. FASE DEL ESQUEMA FINAL DE ENRAIZAMIENTO.

V A R I A B L E	FACTORES DE VARIACION			
	AUXINAS	LUZ	AUX-LUZ	C.V.
SIN CAMBIO APARENTE	NS	NS	NS	—
ENGROSAMIENTO BASE	NS	NS	NS	148.32
INICIA CALLO	NS	NS	NS	74.24
CALLO DESARROLLADO	NS	NS	NS	42.68
PRIMODIO DE RAIZ	NS	NS	NS	—
RAIZ DESARROLLADA	NS	NS	NS	92.71

N.S. = No Significativo

*** = Significancia al 0.05

C.V. = Coeficiente de Variación.

FIGURA 1 a. ESQUEMA DE CALENDARIZACION PARA PROLIFERACION

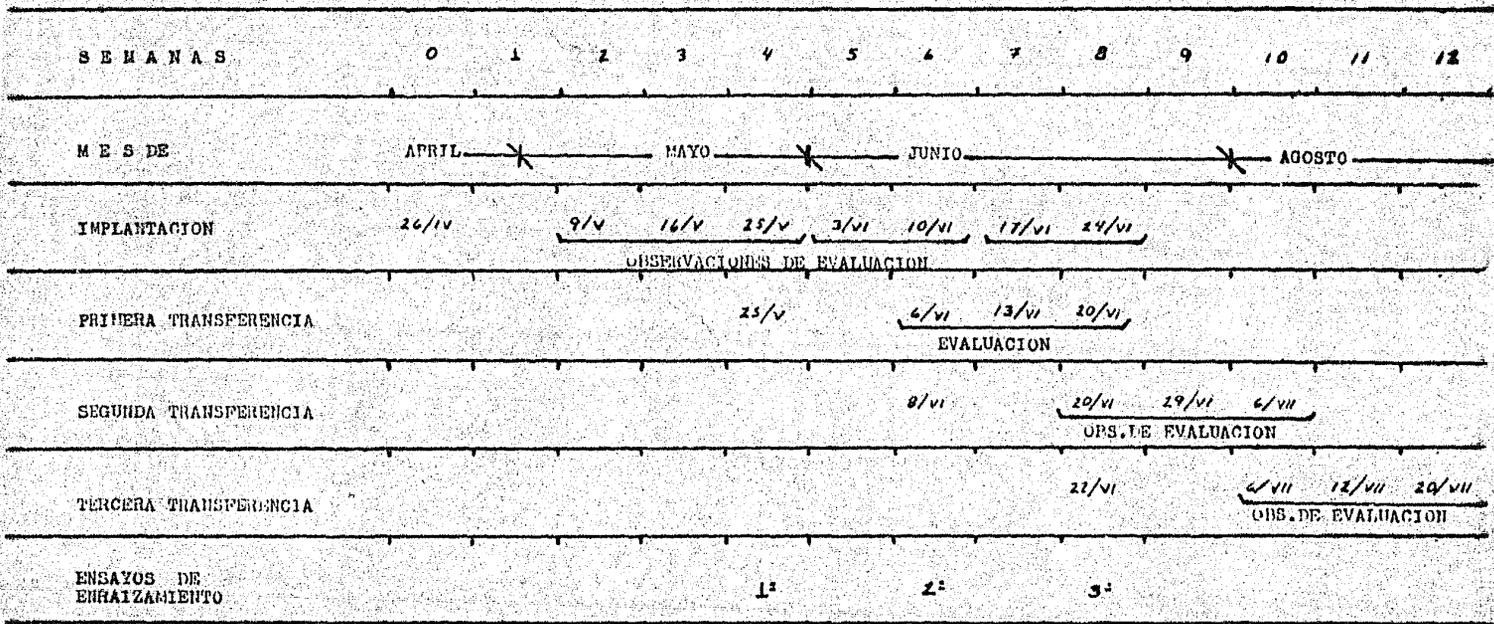
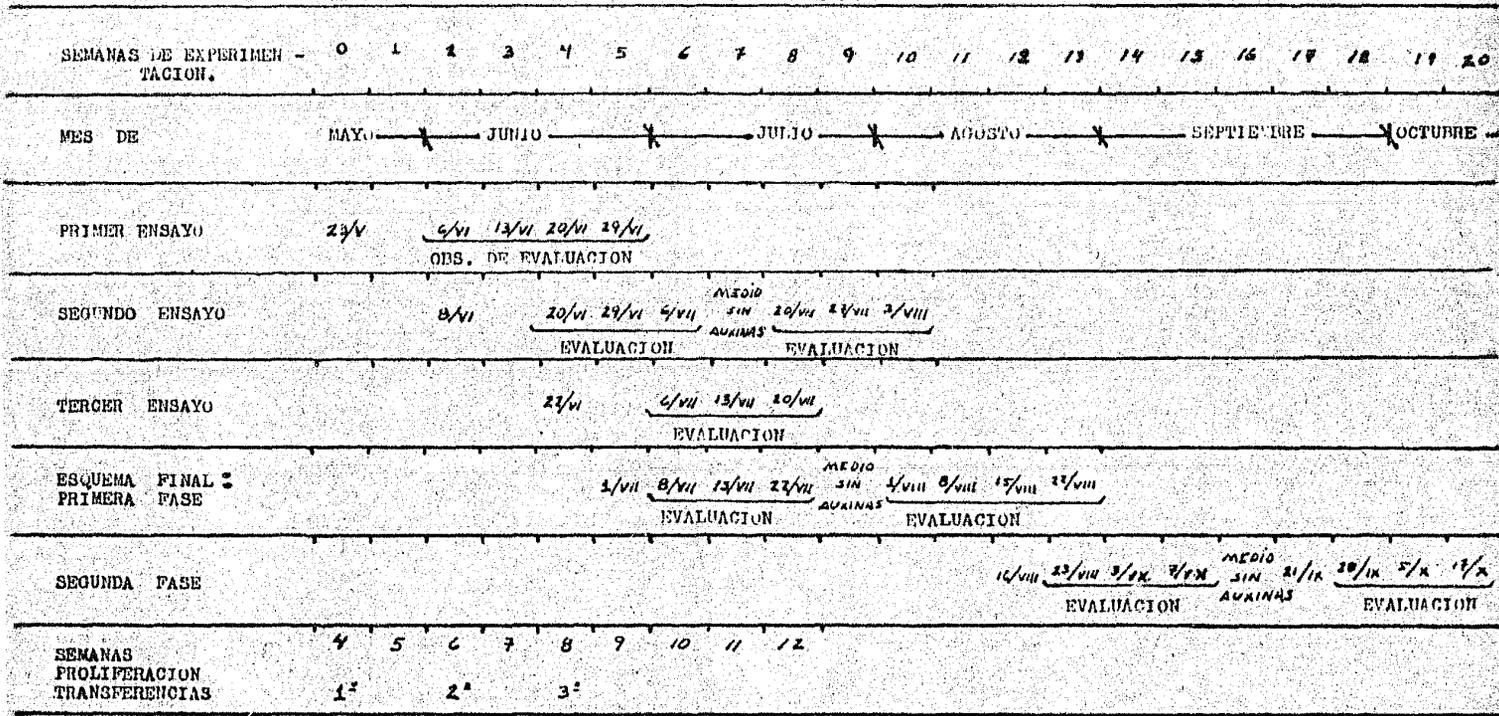


FIGURA 2 A ESQUEMA DE CALENDARIACION PARA EMPAQUETAMIENTO



* LA SEMANA CERO CORRESPONDE AL IMPLANTE Y EN LA PRIMERA SEMANA SE OBSERVO CONTAMINACION

FIGURA 3 DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA PROLIFERACION

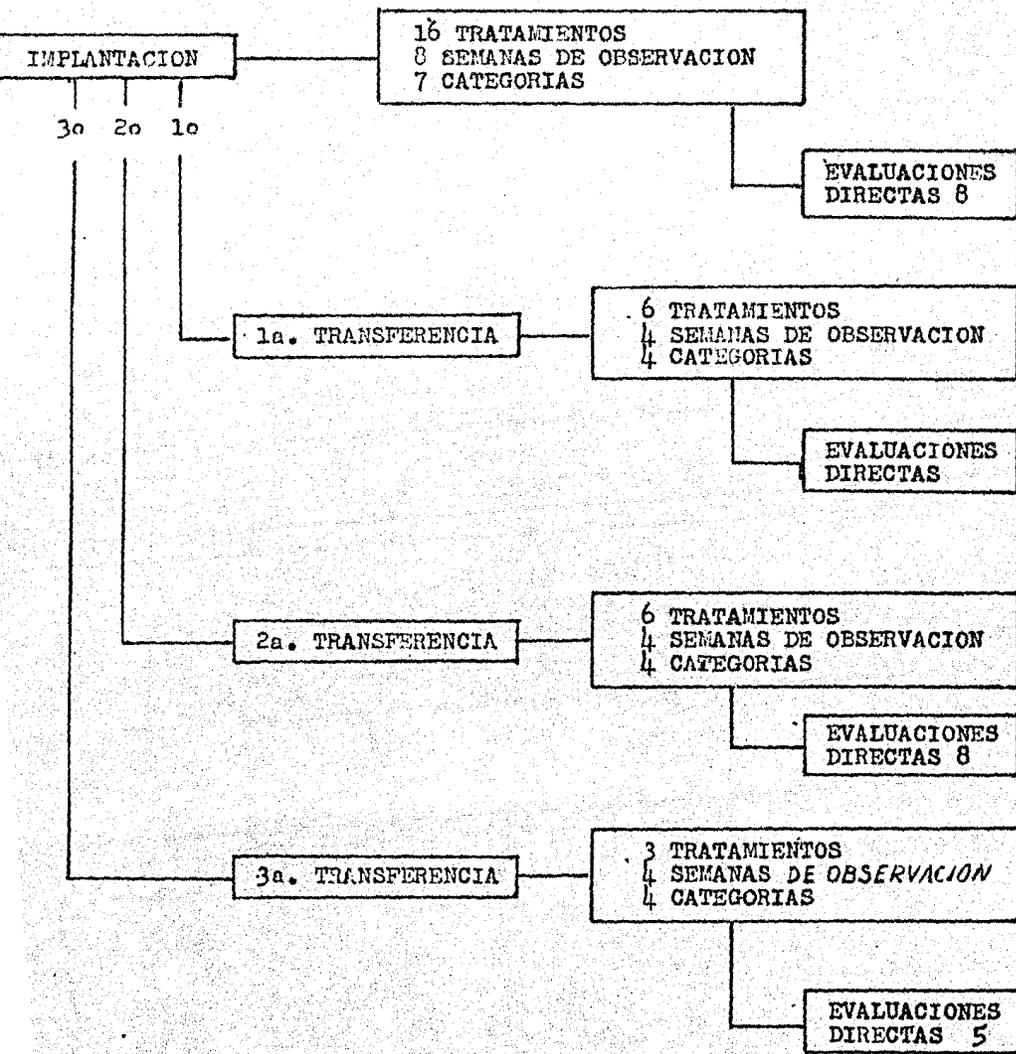
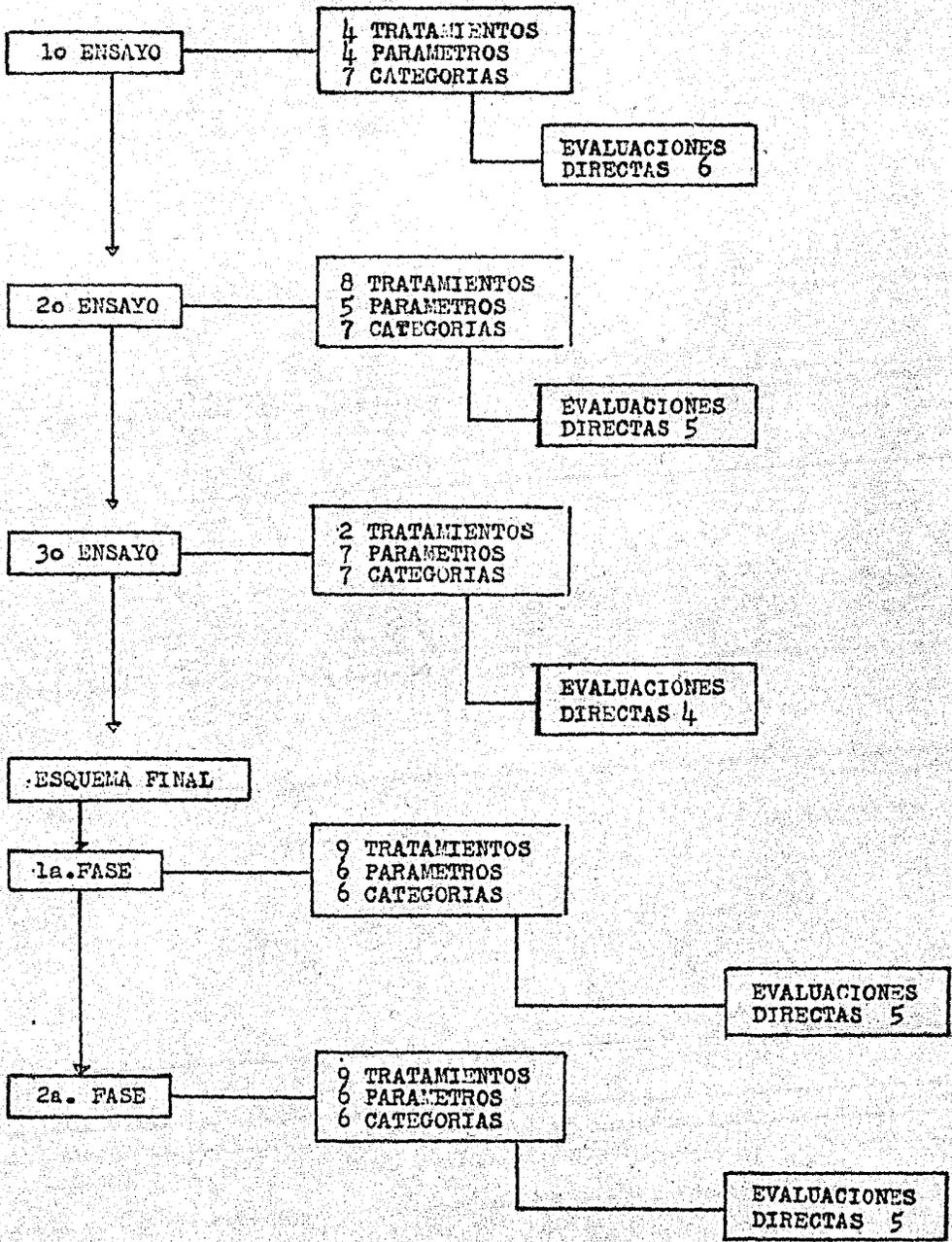


FIGURA 4. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA ENRAIZAMIENTO



LITERATURA REVISADA

- Alfonseca Mora. 1979. Experiencias sobre la multiplicación de algunas especies de frutas tropicales. Fruticultura Mexicana. CONAFRUT. 8,1:3-5.
- Altman, A. and R. Goren. 1974. Interrelationship of abscisic acid and gibberellic acid in the promotion of callus formation in the abscission zone of citrus bud cultures. *Physiol. plantarum*. 32:55-61.
- _____ and _____. 1977. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. *Acta horticultrae*. 78:51-60.
- _____, Y. Gulsen and R. Goren, 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants in vitro. *Plant Physiol.* 69:1-6.
- Barlass, M. and K. G. Skene. 1982. In vitro plantlet formation from citrus species and Hibrids. *Scientia Horticultrae*. 17-333-341.
- Button, J. and J. Kochba. 1977. Tissue culture in the citrus industry. In: Reinert and Bajaj (EDS.) applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlin: 70-92.
- Björkam, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. In: Lange Nobel, Osmond and Ziegler (EDS.) *Physiological Plant Ecology I*, Encyclopedia of Physiology, New Series Springer-Verlag.. (12A): 57-107.
- Boardan, N. K. 1977, comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Anna Rev. Plant Physiol.* 28:355-377.

- Buschman, C. and H.K. Ligenthaler. 1979. The influence of phytohormones on phenolipid composition and photosynthetic activity of thylakoids. In: Applquist and Lilsenberg (EDS.) . Advances in Biochemistry and Physiology of Plant Lipids. Elsevier North-Holand: 145- 150.

- Chaturvei , E.C., A.R. Chowdhury and G.C. Mitra. 1974 (A). Shoot bud differentiation in stem callus tissues of Citrus grandis - and correlated changes in it's free amino acids content. Curr. Sci. India/43:536-537.

- _____, and G.C. Mitra. 1974 (b). Clonal propagation - of citrus from somatic callus cultures. HortScience. 9:118-120

- Cruz P., F. 1983. Propagación In vitro de manzano (Malus pumila Mill). Tesis profesional. FES-C.UNAM. Cuautitlán, Mex. 68pp

- Dirección Gral. de Estadística. 1977. Agenda Estadística. Secretaría de Industria y Comercio. Impreso en Talleres Gráficos de la Nación, México D.F. 270 pp.

- Druart Ph., Cl.L. Kevers and Th. Gaspar. 1982. In vitro promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie-vol. 108. No5:429-436.

- Fosket, D.E. and D.A. Tepper. 1978. Hormonal regulation of growth in cultured plant cells In vitro. 14, No.1:63-75

- Frost. H.B. and R.K. Soost. 1968. Seed reproduction: Developmental of gametes and embryos. In: Reuther, Batchelor and Webber (EDS.) The citrus Industry, Univ, Calif. Berkeley 2:290-324.

- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe and I.K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. In vitro, 12, No. 473-478.
- Gaspar, Th., D. Smith and T. Thorpe. 1977. Arguments supplémentaires en faveur d' une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogénèse. - C.R. Acad. Sc. Paris. 285:327-330.
- Gilaldi, A. Altman and R. Goren. 1979. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia horticulturae*. 10:357-362.
- Gorst, J.R., R. A. de Fossard and M. Slaytor. 1981. The influence of auxins and minerals on root morphogenesis of Eucalyptus ficifolia F. Muell In vitro. In: Proc. Int. Plant Prop. Soc. -- 31:286-295.
- Grahl, H. and A. Wild. 1975. Studies on the content of P-700 and cytochromes in Sinapis alba during growth under two different light intensities. In: Marcelle, R. (ED.) Environmental and Biological Control of Photosynthesis. Junk Publishers. The Hague. pp. 107-113.
- Gresshof, P.M. 1978. Phytohormones and Growth and differentiation of Cells and Tissues cultured In vitro. Phytohormones and Related Compounds. In: Lethm, Goodwin, and Higgins (EDS.) Elsevier North-Holland Biomedical Press. II:1-29.
- Grimblant, U. 1972. Differentiation of citrus stem In vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97:599-603.
- Hartman, H.T., W.J. Flocker and A.M. Kofranek. 1981. Plant Science. Growth, development and utilization of cultivated plants. -

Prentice hall, Inc. New. Jersey. 611-13

- Holzapfel, A., A. Wild and R. Zerbs. 1982 (A). The effect of Kin₁₀ and different light qualities on the content of carbohydrates. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie. Vol. 105:11-20.
- _____, _____ and _____. 1982 (B). The effect of Indol-3 acetic Acid on plants Cultivated under different light intensities. Zeitschrift fur pflanzepysiologie. 108, (5):409-417
- Hunter, S.A., M.J. Foxe and M.J. Hennerty. 1982. The influence of temperature and light intensity on the In vitro propagation of the strawberry (Fragaria x ananassa Duch) Cv. Cambridge. In vitro culture. Acta horticulturae. W. Preil (ED.) XXI st. International horticultural congress 153-59.
- Kochba, J. and J. Button. 1974. The simulation of embryogenesis and embryoid development in habitued ovular callus from the "Shamouti" orange Citrus sinensis as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzepysiologie, 73:415-421.
- _____ and P. Spiguel-Roy. 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of "Shamouti" orange Citrus sinensis. Z. Pflanzenzucht. 69-156-162.
- _____ and _____. 1977. Cell tissue culture for breeding and developmental studies of citrus HortScience . 12 (2):110-114.
- Kordan, A.H. 1963. Growth characteristics of citrus fruit tissue In vitro. Nature (Lond). 198:867-869.
- Maheshwari and Rangaswamy, 1958. Poliembryony and In vitro -

- culture of embryos of Citrus and Manguifera. Indian J.Hort. 15: 275-282.
- Murashigue T. and F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid-growth and bioassays with tobacco tissue culture. Ann Rev. - Plant Physiol 25:135-166.
- _____ and _____. 1974. Plant propagation throught tissue culture Ann Rev.Plant Physiol. 25:135-166.
- Navarro,L.,J. Juarez,J. Ballester y L. Pina 1979. Obtención de plantas nucelares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo Navel Citrus Sinesis (L). Osbeck, por-cultivo de ovulos In vitro.An INIA, (España) Ser.Prot.Veg/ No.12: 95-113.
- Navatel,J.C. 1982. Problemes Lies a la production de porte - greffe d' arbes fruitiers par multiplication In vitro.Fruits 37- No.5:331-336.
- Ochoa Franco,L.E. 1983. Efecto de AIB,ANA y Carbón Activado sobre el enraizamiento de fresa In vitro. Tesis profesional. PES-C. UNAM. Cuatitlán,Mex. 72 pp.
- Primo Millo,E and H.Harada. 1976. Controle hormonal de la for- mation de callus, bourgenos et racines sur des entre-noeuds - de citrange troger (Hibride Citrus sinensis var. Washington NavelxPoncirus trifoliata)Cultives In vitro. An INIA, (Spain) Ser.Prod.Veg./No. 6:9-26.
- Raj Bhansali,R. and H.C. Arya. 1978. Tissue culture propagation

of citrus trees. Proc.Int.Soc.Citriculture:135-140.

- Ramirez Diaz, J.M. 1982. Logros y Aportaciones de la investigación Agrícola en el cultivo de los cítricos. SARH-INIA, México D.F. publicación especial No. 87:40 pp.
- _____ . 1983. Técnicas de producción y utilización de los cítricos en México. SARH-INIA, . México, D.F. publicación especial No. 112: 28pp.
- Rangaswamy. 1959. Morphogenetic response of Citrus ovules to growth adjuvants in culture. Nature. 735-736.
- Sanchez Colín, R. 1979. Experiencias sobre la multiplicación de algunas especies de frutas tropicales. Fruticultura Mexicana . CONAFRUT. año 1, No. 8:3-5.
- Sauton, A., A. and A. Lutz. 1982. Plant regeneration from citrus root meristems. J.Hort. Sci. 57 (2): 227-231.
- Scheider-Moldrick, R. 1982. The influence of light quality and light intensity on regeneration of kalanchoe-blossfeldiana hybrids In vitro culture. Acta horticulturae. W. Freil (ED.), XXI st: Inter. Hort. Congress. p.163-170.
- Skoog F. and D. J. Armstrong. 1970. Cytokinins. Ann. Rev. Plant Physiol 21:359-384.
- Tusa, N., F. Pasquale and L. Radogna. 1978. Research on the micrografting technology in Citrus. Proc. Int. Citriculture p.143-145.
- Vardi A.P. Spieguel-Roy and E. Galun. 1975. Citrus cell culture:

- isolation of protoplasts, planting densities, effect of mutagens and regenerations of embryos. Plant Sci. Letters. 4:231-236.
- Villalobos A., V. 1978. Citricos libres de virus. Apuntes mimeografiados seminario II, semestre de primavera. C.P. Chapingo, - Mex. II pp.
- Villegas M.A. 1982. Propagación de cultivares de manzano Malus pumila Mill., In vitro. Tesis M.C., C.P. Chapingo, Mex. 68 pp.
- Welander, M. and I. Huntrieser. 1980. The rooting ability of - shoots raised In vitro from the apple rootstock A-2 in juvenile and in adult growth phase. Physiol. Plant. 53: 301-306.
- Zerbe, R. and A. Wild. 1980.(a). The effect of Kinetin on the photosynthetic apparatus of Sinapis alba. Photosynthesis Res. 1:53-64.
- _____ and _____. 1980.(b). The effect of indole. 3 acetic acid on the photosynthetic apparatus of Sinapis alba Photosynthesis Res. 1: 81-81.