

# EFECTO DEL EXTRACTO DE MALTA Y DISPONIBILIDAD DE NITRATOS-AMONIO EN LA OBTENCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN 11 GENOTIPOS DE *Citrus*

J.L. Rodríguez-De la O<sup>1</sup>; V.M. Villalobos-Arámbula<sup>2</sup>; H.S. Azpiroz-Rivero<sup>3</sup>; R. Villalobos-Pietrini<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. C.P. 56230,

<sup>2</sup>Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca SEMARNAP, México. D.F. C.P.12410,

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP. Chapingo, Edo. de México. 56230.

<sup>4</sup>Lab. de Mutagenesis Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM, Ciudad Universitaria. Coyoacán, México, D.F.C.P. 04510.

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad embriogénica directa de tejido nucelar *in vitro* en 11 cultivares de *Citrus*, utilizando diferentes constituyentes y medios de cultivo. El porcentaje de formación de embriones somáticos fue afectado por el genotipo, la edad de la semilla, la presencia coadyuvante de extracto de malta y la disponibilidad de las fuentes nitratos y amonio. El tejido nucelar de seis cultivares desarrolló respuestas embriogénicas en un medio con las sales MS al 100%, más cinco vitaminas, 500 mg·litro<sup>-1</sup> de extracto de malta (EM) y adicionando a los niveles de nitratos, 600 mg·litro<sup>-1</sup> de nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>), destacando los genotipos de naturaleza poliembriónica como el cultivar Chata (*C. sinensis*) con 53% y la mandarina 'Mónica' (*C. sinensis* x *C. reticulata*) con 42%. Cuatro cultivares produjeron embriones somáticos. Cuando se utilizó medio MS, con 500 mg·litro<sup>-1</sup> de EM y disminuyendo 200% los niveles de amonio y nitratos, en el cultivar Mónica (*C. sinensis* x *C. reticulata*) destacó presentando hasta 60% de respuesta. El tejido nucelar en semillas de toronja (*C. paradisi*) con una madurez de 22.2 semanas, no presentó respuesta en los medios de cultivo y constituyentes empleados. Finalmente el medio de cultivo con las sales de MS con 0.1 mg·litro<sup>-1</sup> de AIA, 0.1 mg·litro<sup>-1</sup> de kinetina y 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) y otro con las sales MS y 500 mg·litro<sup>-1</sup> de extracto de malta, promovieron la germinación de embriones nucleares con un diámetro de 5 a 6 mm, en 6 semanas de cultivo.

**PALABRAS CLAVE:** Embriogénesis, tejido nucelar, proembriones, germinación, cultivo de tejidos.

## EFFECT OF MALT EXTRACT AND AMMONIUM NITRATE ON *in vitro* CULTURES TO OBTAIN SOMATIC EMBRYOS OF 11 *Citrus* GENOTYPES

## SUMMARY

Genotype, seed age, presence of malt extract coadjuvant and availability of ammonium and nitrate sources influenced the percentage of somatic embryo formation obtained from nucellar tissue. There were embryogenetic responses in the nucellar tissue for 6 cultivars growing in 100% MS salt medium supplemented with 5 vitamins, 500 mg·liter<sup>-1</sup> malt extract (ME) and additions of 600 mg·liter<sup>-1</sup> of sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>) to the nitrate levels. Outstanding were the polyembryonic genotypes such as the cultivar 'Chata' (*C. sinensis*) with 53% and the mandarin orange 'Monica' (*C. sinensis* x *C. reticulata*) with 42%. Four cultivars produced somatic embryos when MS salt medium was supplemented with 500 mg·liter<sup>-1</sup> ME, and the ammonium and nitrate levels were decreased 200%. The genotype Monica (*C. sinensis* x *C. reticulata*) was outstanding, showing embryogenetic responses of 60%. The nucellar tissue in grapefruit seeds (*C. paradisi*) at 22.2 weeks maturity showed no response in the medium used. Finally, the salt culture with 0.1 mg·liter<sup>-1</sup> IAA, 0.1 mg·liter<sup>-1</sup> kinetin, and 1.0 mg·liter<sup>-1</sup> gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), and media with MS salts, 500 mg·liter<sup>-1</sup> ME, promoted the germination of nucellar embryos with 5 to 6 mm diameter after 6 weeks of culturing.

**KEY WORDS:** Embryogenesis, nucellar tissue, proembryos, germination, coadjuvants, tissue cultive.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente diversos autores han mostrado un especial interés en el estudio de los factores que controlan la capacidad de células y tejidos para regenerar plantas *in vitro*, como un requerimiento previo a la aplicación de cualquier técnica biotecnológica. En el mejoramiento genético del género *Citrus*, se han venido explorando diversas técnicas de tipo biotecnológico entre las que destacan las del ADN recombinante o ingeniería genética, básicamente para la obtención de plantas resistentes a virus (Moore *et al.*, 1992). Uno de los mecanismos más estudiados para la obtención y la multiplicación de plantas de *Citrus* ha sido la embriogénesis somática directa o indirectamente a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar de diferentes cultivares, en donde se ha considerado el efecto de diferentes factores que promueven la inducción, el mantenimiento y la germinación *in vitro* de embriones somáticos, hasta obtener plantas completas (Wann, 1988). En los estudios recientes sobre la embriogénesis en *Citrus* se han examinado diferentes aspectos incluyendo histocitología, herencia, variación, fisiología y bioquímica, y hasta ahora los resultados indican que la regulación génica del desarrollo de embriones nucleares *in vitro* es la clave para resolver los mecanismos de la embriogénesis *in vitro* y que diferentes cultivares pueden tener variación en este aspecto, aunado a las condiciones de su manejo experimental. Por ello se pueden encontrar varias respuestas con base en el estudio de la expresión de genes que controlan la poliembriónia en diferentes cultivares (Zheng y Chen, 1994). Otras evidencias demuestran que las células en este tipo de tejido, pueden encontrarse en un estado predeterminado o proembriogénico, por ello para lograr formar embriones se requiere poca o nula participación de reguladores de crecimiento en forma exógena, aunque en ocasiones su participación en los medios de cultivo limita la respuesta *in vitro* (Sim *et al.*, 1988). Las investigaciones sobre la embriogénesis somática en *Citrus* han demostrado que las respuestas son influenciadas por el genotipo y la participación de coadyuvantes en el medio de cultivo como el extracto de malta y la caseína hidrolizada (Parthasarathy y Nagaraju, 1994). Además de la embriogénesis, el mantenimiento, la madurez y el tamaño de los embriones somáticos desarrollados *in vitro*, son aspectos importantes que van a influir para llevar a cabo su germinación hasta obtener plantas completas. El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental evaluar las respuestas embriogénicas de diferentes genotipos de *Citrus*, con el propósito de identificar las mejores respuestas y así presentar un sistema de regeneración directa de embriones a partir de tejido nucelar

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos para evaluar tanto las respuestas para la inducción de la embriogénesis somática hasta la germinación de embriones, se realizaron en forma directa a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar en frutos de

once genotipos de *Citrus* colectados en el poblado de Cazonos, Veracruz, México, en diferentes fechas después de haber llevado a cabo su floración (SDF). Los cultivares fueron los siguientes: 'Valencia Tardía' (*Citrus sinensis*) (17.2 Semanas después de su floración (SDF), naranja 'Valencia Temprana' (*C. sinensis*) (15.6 SDF), mandarina 'Mónica' (*C. sinensis* x *C. reticulata*) (15.6 SDF), 'Reyna' (*C. reticulata*) (15.6 SDF), tangelo 'Mineola' (*C. paradisi* x *C. reticulata*) (15.6 SDF), 'Chata' *C. sinensis* (17.2 SDF), tangerina (*C. reticulata*) (15.6), naranja agria (*C. aurantium*) (13.0 SDF), toronja blanca (*C. paradisi*) (22.2 SDF), toronja rosada (*C. paradisi*) (22.2 SDF), toronja doble rojo (*C. paradisi*) (22.2 SDF). Los frutos de los diferentes *Citrus* fueron colocados en recipientes para ser lavados con agua y detergente en cada genotipo se procedió a abrir los frutos con navaja para aislar las semillas sin dañarlas, posteriormente, se pusieron en agitación durante 20 minutos en 500 ml de agua con detergente (agregando gotas del surfactante Tween 20) y depositándose en alcohol diluido al 15% durante 3 minutos, se enjuagaron con agua estéril y finalmente se les dio un tratamiento con hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 3% durante 15 minutos y se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril. Después se colocaron en cajas petri y con ayuda de pinzas y bisturís con navajas del No. 11 se procedió a eliminar las cubiertas de las semillas observando con un microscopio estereoscópico Wild TYP 308700 Heerbugg, Switzerland. Lente Plan 1X y 10x 121. Ya expuestos los cotiledones, y tomando en cuenta la región embrionaria, fueron separados los embriones de origen cigótico, dejando para su cultivo a los tejidos nucleares y a los cotiledones, considerando en su siembra *in vitro* la posición de la calaza y del micrópilo como lo comentan Navarro *et al.* (1984). En los medios de cultivo se emplearon como base las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementándolas con 3% de sacarosa mg·litro<sup>-1</sup> de mio-inositol, solidificándolos con 10 g de bacto agar, ajustando su pH a 5.7 ± 0.1 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N. Los experimentos se incubaron con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a temperatura de 26 ± 2°C durante el día 24 ± 2°C durante la noche e intensidad lumínica 1700 a 2100 lux con lámparas de luz fluorescente "flurotest SLIMLINE" de 75W. Cabe mencionar que varios de los once materiales utilizados son de naturaleza poliembriónica, como es el caso de la mandarina 'Mónica' que se originó de la cruce de dos genotipos poliembriónicos *C. sinensis* x *C. reticulata*. Otros genotipos como *C. paradisi*, presentaron escasez de semillas en los frutos colectados, esta característica limitó su manejo estadístico y para sus respuestas se calcularon porcentajes para las variables: Contaminación, oxidación, formación de embriones, presencia de callos, tejidos con respuesta y en algunos casos la germinación. La evaluación se efectuó a las 12 semanas.

**CUADRO 1. Medios de cultivo empleados para la obtención de embriones somáticos en forma directa a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar de *citrus*.**

Medios	Fuentes de Nitrógeno (mg·litro <sup>-1</sup> )	Suplementos (mg·litro <sup>-1</sup> )
N	Las del MS al 100%	Tiamina, HCL 0.2, piridoxina. HCL 1.0, ac nicotínico 1.0, glicina 4.0, mio-inositol 100, extracto de malta 500 y sacarina 5%.
R	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1650, KNO <sub>3</sub> 1900, Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 1000, NaNO <sub>3</sub> 600.	Tiamina HCL 0.2, piridoxina HCL 1.0, ácido nicotínico 1.0, glicina 4.0, mio-inositol 100, y extracto de malta 500.
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.8 (10 μmol) KNO <sub>3</sub> 0.5 (5 μmol) Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.4 (3 μmol)	Tiamina. HCL 0.2, piridoxina HCL 1.0, ácido nicotínico 1.0, glicina 4.0, mio-inositol 100, extracto de malta 500.
C	Las de MS al 100%	Sin suplementos

### Germinación *in vitro* de embriones somáticos.

Los embriones somáticos obtenidos de diferentes genotipos de *Citrus*, se aislaron y separaron en tres grupos, de acuerdo a su diámetro, con el propósito de determinar el estado óptimo para llevar a cabo su germinación. El primer grupo, que incluyó embriones menores o iguales a 1 mm de diámetro, el segundo grupo constituido por embriones de 2 a 3 mm, y el tercero por embriones de 5 a 6 mm de diámetro. Los embriones fueron sembrados en cuatro medios de cultivo sólidos (Cuadro 2), colocando en promedio entre 30 y 40 embriones en cada medio con 20 repeticiones. La evaluación se efectuó a las 6 semanas después de haber llevado su cultivo *in vitro*.

**CUADRO 2. Medios de cultivo usados para la germinación de embriones somáticos de 11 genotipos de *Citrus*.**

Medio	MS (%)	Suplementos (mg·litro <sup>-1</sup> )	Reguladores (mg·litro <sup>-1</sup> )
G1	100	Tiamina 0.4, HCL mio-inositol 100, Caseína hidrolizada 100, Sacarosa 3%	Kinetina 2.0
G2	100	Tiamina. HCL 0.4 Mio-inositol 100 Caseína hidrolizada 400 Sacarosa 3%	Kinetina 0.1 AIA 0.1 AG <sub>3</sub> 1.0
G3	50	Sin suplementos	Benciladenina 5.0
G4	100	Tiamina HCL 0.4 Mio-inositol 100 Caseína hidrolizada 400 Extracto de malta 500 Sacarosa 3%	

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Influencia del extracto de malta (EM) y vitaminas en la obtención de embriones somáticos directamente del tejido nucelar.

La producción de embriones somáticos de tejidos nucelar de los genotipos de *Citrus* fue prácticamente nula en el medio C, que incluyó únicamente las sales del medio MS sin suplementos vitamínicos, coadyuvantes o fuentes de carbono. La adición de 500 mg·litro<sup>-1</sup> del extracto de malta a las sales del medio MS, suplementadas con vitaminas y sin la adición de reguladores de crecimiento (medio N), produjo hasta 50% de respuesta en la obtención de embriones a partir del tejido nucelar cultivado *in vitro* en el cultivar Mónica (*Citrus sinensis* x *C. reticulata*) colectado 15.6 semanas después de su floración. Por otra parte con este mismo medio, la producción *in vitro* de embriones somáticos se observó en un 10% en los cultivares Valencia Temprana (*C. sinensis*) con 15.6 SDF, 'Reyna' (*C. reticulata*) 15.6 SDF y toronja doble rojo (*C. paradisi*) de 22.2 SDF. Los porcentajes de respuestas logrados con la adición del extracto de malta (Figura 1) también han sido obtenidos por diversos autores, quienes en *Citrus* la ubican como uno de los mejores coadyuvantes de embriogénesis somática, evitando el empleo de reguladores de crecimiento (Moore, 1985; Spiegel-Roy y Vardi, 1984; Kobayashi *et al.*, 1984).

### Relación Nitratos-Amonio.

El mayor número de cultivares de *Citrus* formaron embriones somáticos en el medio R, que incluye las sales inorgánicas de MS con suplementos, vitaminas y con varios niveles de nitratos, destacando 'Chata' (*C. sinensis*) que produjo embriones en 53% de tejidos nucleares sembrados, el cultivar Mónica presentó respuestas en 42% de los tejidos sembrados, mientras que aproximadamente 20% de los cultivares Reyna, Chata y Valencia Tardía formaron embriones, respuesta que disminuyó al 10 % en el cultivar Valencia Temprana, cuando se disminuyeron los niveles de nitratos y amonio hasta en 200 %, dentro de las sales inorgánicas de MS medio A, las respuestas para la obtención de embriones se observó en cuatro cultivares destacando la mandarina 'Mónica' de naturaleza poliembriónica con una respuesta de hasta 60%, seguida por el cultivar Reyna (20%) y los cultivares Valencia Tardía y Chata, que tuvieron un 10% de respuesta (Figura 1). La formación de embrioides en *Citrus*, frecuentemente se observa a partir de las células de tejidos nucleares, ligadas al área micropilar y final del saco embrionario. Muchas veces los tejidos de las semillas bajo cultivo *in vitro* permiten que los embriones nucleares sean suministrados de nutrientes dentro del endospermo permitiendo su nutrición y desarrollo, debido a ello el cultivo de embriones puede ser utilizado para la propagación clonal. Los porcentajes de embriogénesis somática encontrada en los cultivares, dependiente de la dispo-

nibilidad de amonio y nitratos en el medio de cultivo fueron fuertemente influenciados por el cultivar y la edad de la semilla al momento de su siembra, ya que existen investigaciones que indican en algunos cultivares la embriogénesis se incrementa cuando se disminuyen sustancialmente factores (Nel, 1987; Song *et al.*, 1991), aunque otros estudios señalan que dentro de los constituyentes básicos del medio de cultivo que tienen mucha influencia para las respuestas embriogénicas son la disponibilidad adecuada de amonio ( $\text{NH}_4$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ), de hecho para algunos cultivares de *Citrus*, resulta muy importante precisar esta relación (Niedz, 1994). La embriogénesis somática a partir del cultivo de tejidos nucelar fué prácticamente nula en los cultivares de Naranja Agria con 13 semanas después de su floración y en los cultivares de toronja, con una madurez de las semillas de 22.2 semanas, por lo que se comprueba lo señalado por Grosser (1994); y Gmitter *et al.* (1990) quienes comentaron que semillas con periodos mayores a los 16 y 18 semanas después de su floración resultan poco óptimas para inducir la embriogénesis somática *in vitro*. Lo anterior se observa en la Figura 1, ya que las mejores respuestas se lograron en los genotipos cuya madurez osciló entre 14 y 15 semanas después de su floración.

#### Germinación *in vitro* de embriones somáticos.

Se observó que las mejores respuestas hacia la formación de raíces y tallos (germinación) se obtuvieron a las seis semanas en los embriones de 5 a 6 mm de diámetro en un medio con las sales MS, suplementado con las vitaminas normales y agregando  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de AIA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$ ,  $0. \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  kinetina, llegando a obtener hasta 40% de germinación; En este medio los embriones de 1 mm y 2 a 3 mm se mantuvieron como estructuras verdes sin llegar a germinar. La adición de  $500 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de extracto de malta, en el medio con las sales MS y suplementos estimuló la germinación en 60% de embriones con diámetro de 5 a 6 mm; los embriones de 1 mm y de 2 a 3 mm aumentaron su tamaño, sin lograr su germinación. En algunos casos la obtención de plantas completas a través de estos esquemas, ha parecido un factor crítico aún cuando se tenga la reproducción de gran número de embriones somáticos pues han encontrado bajos porcentajes de conversión haciendo muy difícil y prácticamente nula la recuperación de plantas. La adición  $400 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de caseína hidrolizada y  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de kinetina en el medio básico de MS (medio  $\text{G}_1$ ) produjeron el desarrollo de raíces y tallos en cuatro semanas en tangerina (Figura 2), esta respuesta lograda con el empleo caseína hidrolizada ha sido reconocida para lograr tanto la madurez y como la germinación de embriones somáticos (Trigiano *et al.*, 1988).

La proliferación abundante de raíces y poco desarrollo de brotes durante la germinación de los embriones (Figura 3) se observó a las cuatro semanas de cultivo, en los

cultivares Reyna (*C. reticulata*), Mónica (*C. sinensis* x *C. reticulata*) y tangerina (*C. reticulata*) cuando en las sales inorgánicas de MS se adicionó  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de kinetina,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de AIA y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$ . (Medio  $\text{G}_2$ )

Estas respuestas coincidieron con algunas logradas con los genotipos poliembriónicos (*C. reticulata* y *C. sinensis*), así como la acción debida al  $\text{AG}_3$  como efecto primario para estimular el enraizamiento *in vitro* de embriones somáticos en *Citrus* (Moore, 1985). Las sales inorgánicas MS, diluidas al 50%. con la adición de  $\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de bencilaminopurina (medio  $\text{G}_3$ ), promovió la formación de callos en los embriones cultivados *in vitro*. Esto coincide con (Gmitter *et al.*, 1990), quién mencionó que la utilización de los niveles elevados de citocininas o de auxinas se promueve la formación de callos en muchos de los explantes cultivados *in vitro*. En los experimentos realizados, la adición de  $500 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de extracto de malta al medio con las sales MS y suplementos (medio  $\text{G}_4$ ), participó como uno de los principales coadyuvantes de la embriogénesis somática en los genotipos de *Citrus* estudiados. Así mismo, su presencia promovió la germinación *in vitro* de embriones, destacando las respuestas encontradas en tangerina, en 'Valencia Tardía', 'Chata' y 'Reyna' Por lo que respecta al cultivar Mónica la germinación no se presentó (Figura 4).

La embriogénesis somática obtenida a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar puede ser utilizada para la clonación de diferentes cultivares de *Citrus* desde el punto de vista de la disponibilidad de material libre de patógenos; Al mismo tiempo puede utilizarse como un sistema que permite identificar genotipos con alta capacidad embriogénica para explorar en sus tejidos algunas de las técnicas de transformación genética y aumentar la posibilidad de obtener un mayor número de plantas transformadas. Una producción continua de embriones o embrioides, como puede apreciarse en la Figura 6 (A) puede explicarse desde el punto de vista del número de divisiones mitóticas que en forma repetida se presentan en células individuales generalmente localizadas sobre la superficie de los tejidos potencialmente embriogénicos. Las células que son destinadas para dar origen a los embriones pueden caracterizarse por la densidad de su citoplasma, largos núcleos contenidos de plastidios y almidón, una rica población de ribosomas y esferosomas. Existe una continuidad citoplásmica con células vecinas a través de numerosos plasmodesmos cuyas conexiones desaparecen durante el desarrollo de los embriones. Figura 5 (C3). Las características y la habilidad de la conversión de embriones a plantas, tienen la participación de diversos factores como los sistemas de cultivo, genotipos, balance de reguladores de crecimiento y sobre todo la influencia del control genético, ya que recientemente hay investigaciones que demuestran que en el desarrollo de embriones somáticos y su germinación (Figura 6) existe un control genético, que evidencia la formación de embriones nucleares (Charmet y Bernard, 1984).

## CONCLUSIONES.

El presente estudio permitió identificar como estrategia y en forma previa a los trabajos de transformación genética de *Citrus* las respuestas embriogénicas en los genotipos *Citrus* empleados, destacando los de naturaleza poliembriónica, observándose heterogeneidad entre los cultivares empleados, debido principalmente a la madurez de las semillas, al genotipo y a los constituyentes del medio de cultivo. Los balances de nitratos-amonio, vitaminas y extractos de malta suministrados de acuerdo con la fórmula de MS, favoreciendo la producción de embriones somáticos en más del 50% de los cultivares estudiado, no obstante al disminuir la disponibilidad de amonio-nitratos se obtuvo respuesta en solo cuatro genotipos y un 60% de frecuencia en el cultivar Mónica (*C. sinensis* x *C. reticulata*) la germinación de embriones fue lograda ubicando su tamaño y respondiendo de mejor forma en los medios de cultivo con ácido giberélico y el extracto de malta. Cabe destacar que los tratamientos que derivaron callos embriogénicos, son motivo de otro estudio donde se realizará la transformación genética buscando las características de los callos de acuerdo con su capacidad regenerativa o embriogénica hasta contemplar la obtención de uniforme de embriones hasta derivar plantas completas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al M. C. Baldomero Alarcón por haber facilitado los genotipos *Citrus* del estado de Veracruz, México, al apoyo técnico de Maribel Pacheco y Gisela García de la Rosa del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia, así como la revisión al presente manuscrito por parte del Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

## LITERATURA CITADA

- CHARMET, G; BERNARD, S. 1984. Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid triticale (*X. triticosecale* Wittmack). Theoretical and Applied Genetics 69: 55-61.
- GMITTER, F. G JR; LING, X. B; DENG, X.X. 1990. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro* Theor. Appl. Genet. 80(6): 785-790.
- GROSSER, J.W. 1994. *In vitro* culture of tropical fruits, pp. 475-495. In: Plant Cell and Tissue Culture. Indra K. Vasil and Trevor A. Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers.
- KOBAYASHY, S; IDEKA Y.Y.; NAKATANI, M. 1984 Induction of nucellar callus from orange *C. sinensis* Osb. Ovules and uniformity of regenerated plants. Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan 5: 43-54.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE S.D.; CLINE, K. 1992. *Agrobacterium* mediated transformation of transgenic plants. Plant Cell Report 11: 238-242.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE K. 1992. *Agrobacterium* mediated transformation of transgenic plants. Plant Cell Report 11: 238-242.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 373-397.
- NAVARRO, L; ORTIZ, J.M; JUÁREZ, J. 1985. Aberrant *Citrus* plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. HortScience 20: 214-215.
- NEL, M. 1987. *In vitro* culture of Citrus meristem. Information Bull. Citrus and Subtropical Res. Inst. Nelspruit, South Africa 175: 9
- NIEDZ, R.P. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the of nitrate to ammonium nitrogen. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 398: 1-5
- NITO, N; IWAMASA, Y.M. 1990. *In vitro* plantlet formation from juice vesicle callus of Satsuma *Citrus unshiu* Marc. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 20: 137-140.
- PARROT, W.A; DRYDEN, G; VOOGT, S; HILDENBRAND, D.F; COLLINS, G.B; WILLIAMS, E.G. 1988. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro* Cell Devel. Biology 24: 817-20.
- PARTHASARATHY, V.A; NAGARAZU V.A. 1994. Effect of NAA and extract on *in vitro* growth of excised embryos of *Citrus* Tropical Agri. 12: 107-111.
- SAAD, S. 1975. Factors affecting the growth of lemon *Citrus* roots meristem. Journal of Horticultural Science 57: 227-231.
- SIM, G; LOH, C; GOH, G. 1988. Direct somatic embryogenesis from protoplast of *Citrus mitis* Blanco. Plant Cell Report 7: 5-8
- SONG, WS; OH, S.D; CHO, H.M. 1991. Plant regeneration in Dangyooza (*Citrus gryis* Osbeck) through somatic embryogenesis. 2. Effect of different combination or alone nitrogen source and 2,4-D on somatic embryogenesis. Research Rep. of the Rural Development Administration Biotecology 33(2): 22- 27.
- SPIEGEL-ROY; VARDI. P.A. 1984. *Citrus*, pp. 335-372 In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada (eds.) Handbook of cell culture. Mac Millan Publs. New York, USA.
- STARRANTINO, A; CAPONETTO. J. 1990. Effect of cytokinin on embryogenic callus formation from undeveloped ovules of orange. Acta Horticulture 280: 191-194.
- TRIGIANO, R.N; BEATY, R.M; GRAHAM, E.T. 1988. Somatic embryogenesis from immature embryos of redbud *Cercis canadensis*. Plant Cell Report 7: 148-150.
- WANN, S.R. 1988: Somatic embryogenesis in woody species Hort. Rev. 10: 153-177.
- ZHENG, Z. L.; CHEN, L.G. 1994. Embryogenesis in *Citrus* J. Fruits Sci. 11(1): 48-52.

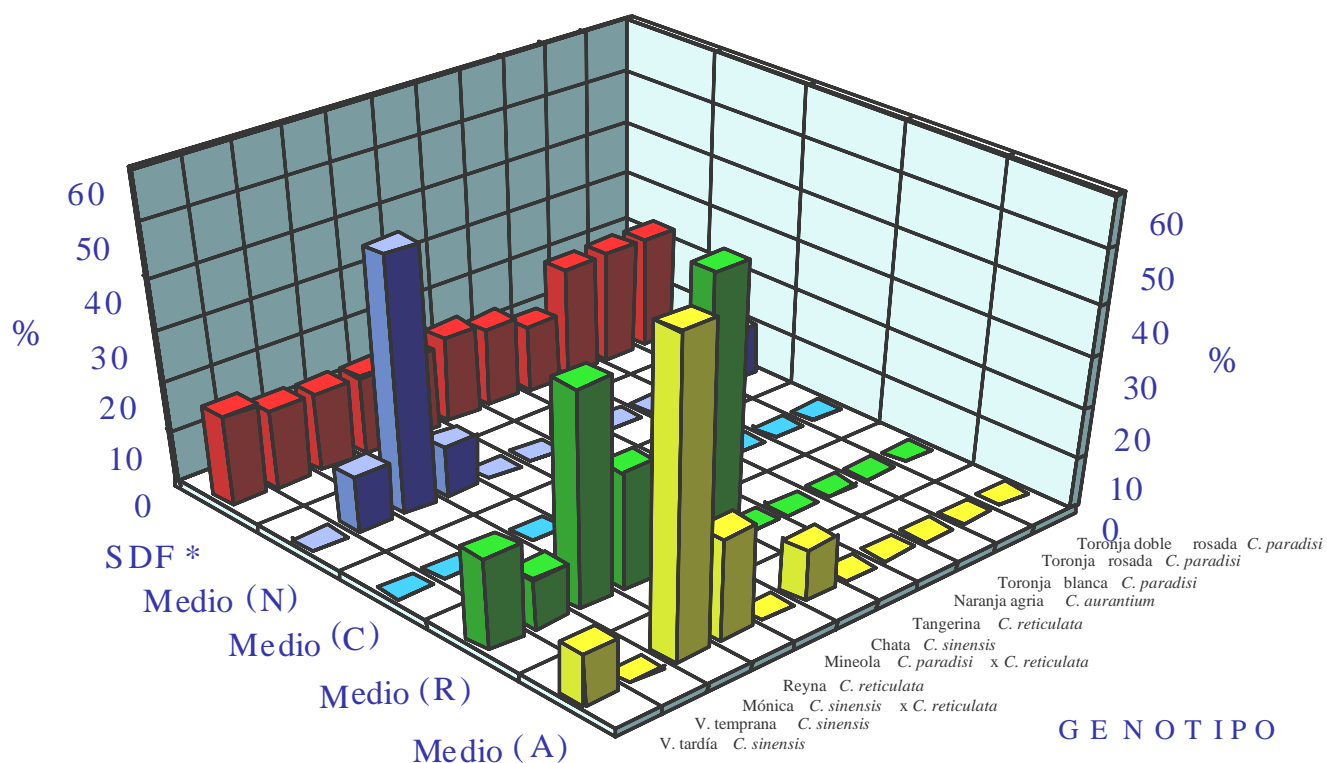


Figura.1. Porcentajes de embriones somáticos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de tejido nucelar de semillas de once cultivares de *Citrus*, empleando cuatro medios de cultivo: Medio N Sales MS bajo la influencia de 500 mg-litro<sup>-1</sup> de extracto de malta. C. Sales MS sin la presencia de reguladores ni coadyuvantes. R Sales MS con fuentes de nitratos y amonio completos y A Sales MS con las fuentes de amonio y nitratos diluidos en un 200%. SDF (Semanas después de floración).

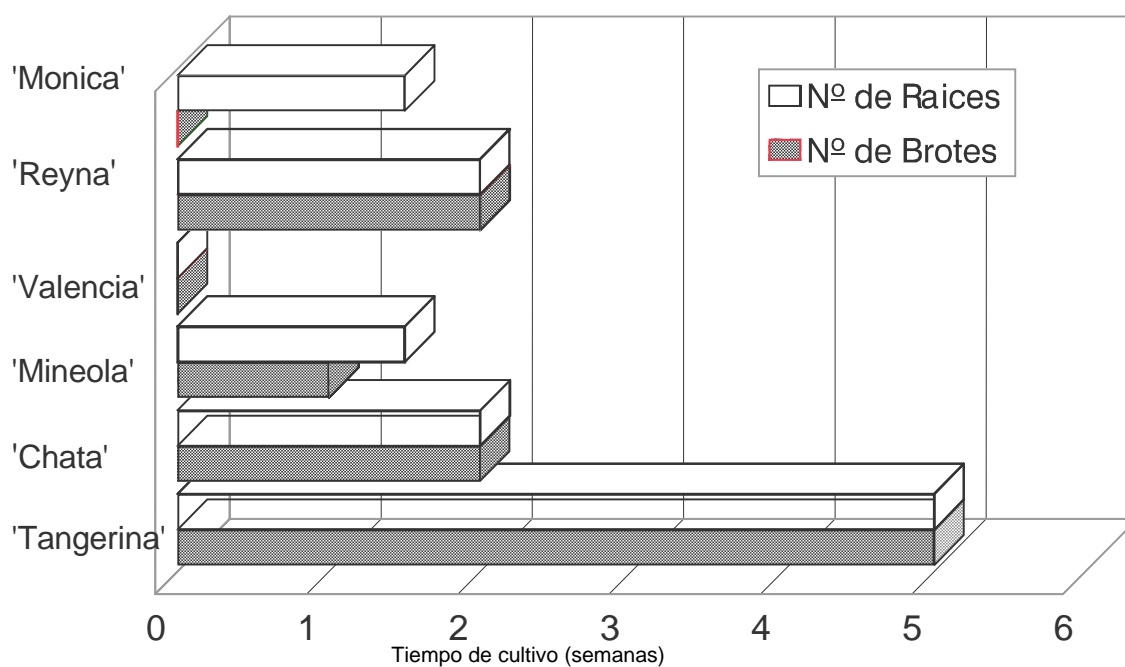


Figura.2 Germinación de embriones nucleares obtenidos *in vitro* en seis cultivares de *Citrus*, en medio de cultivo con las sales inorgánicas de MS, suplementado con 2.0 mg-litro<sup>-1</sup> de kinetina y 400 mg-litro<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada (medio G<sub>1</sub>).

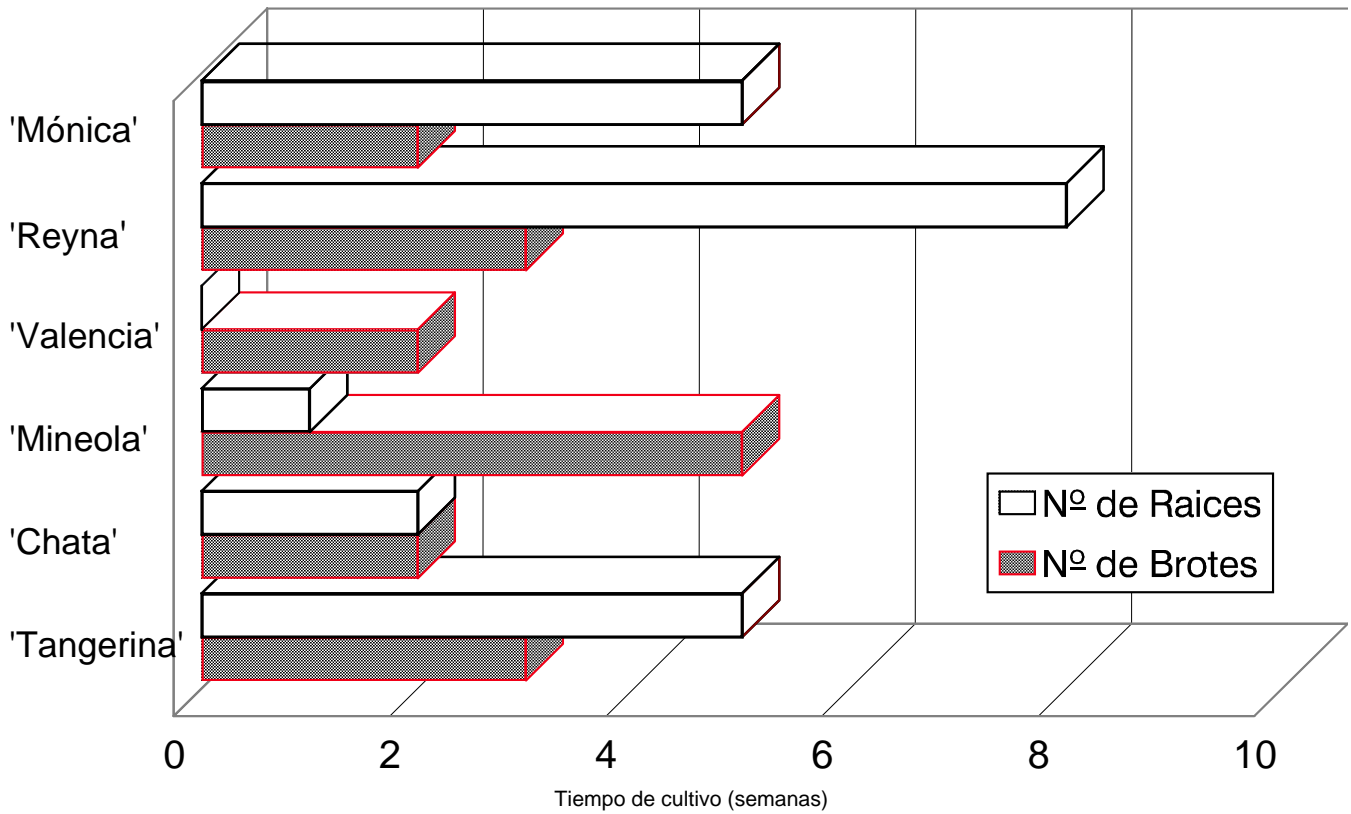


Figura 3. Germinación *in vitro* de embriones nucelares de seis cultivares de *Citrus* empleando un medio con las sales de (MS) (1962) al 100% con 0.1 mg-litro<sup>-1</sup> de kinetina, 0.1 mg-litro<sup>-1</sup> de AIA, y 1.0 mg-litro<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (medio G<sub>2</sub>).

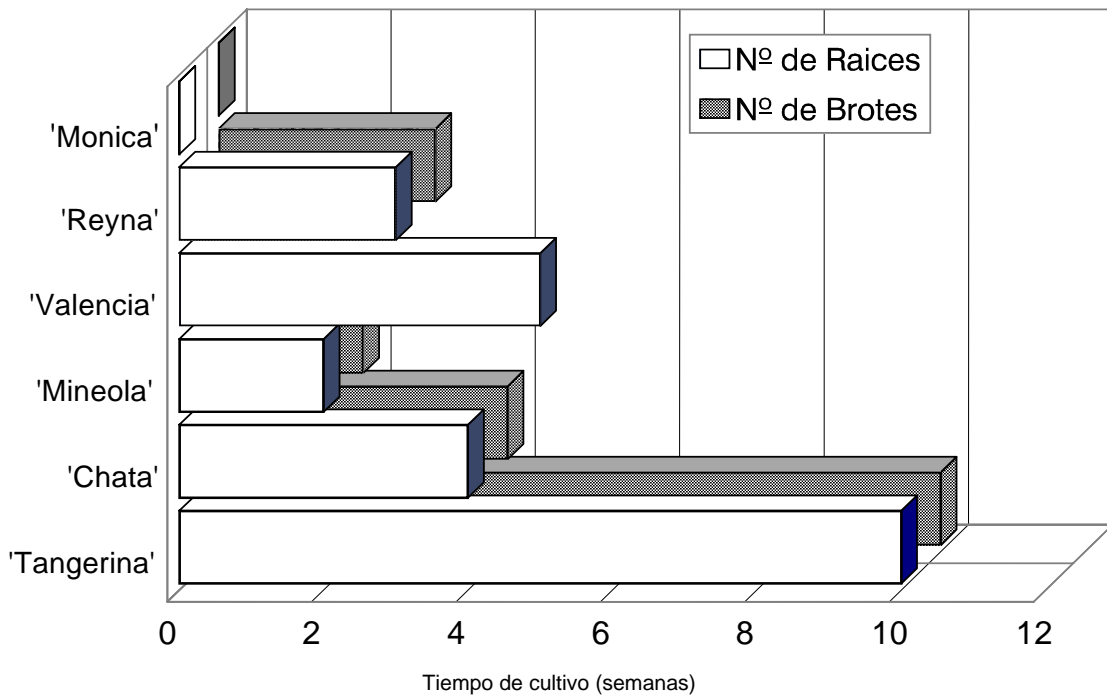


Figura 4. Germinación *in vitro* de embriones nucelares de seis cultivares de *Citrus*, empleando un medio conteniendo las sales inorgánicas de MS (1962) al 100% y 500 mg-litro<sup>-1</sup> de extracto de malta (G<sub>4</sub>).

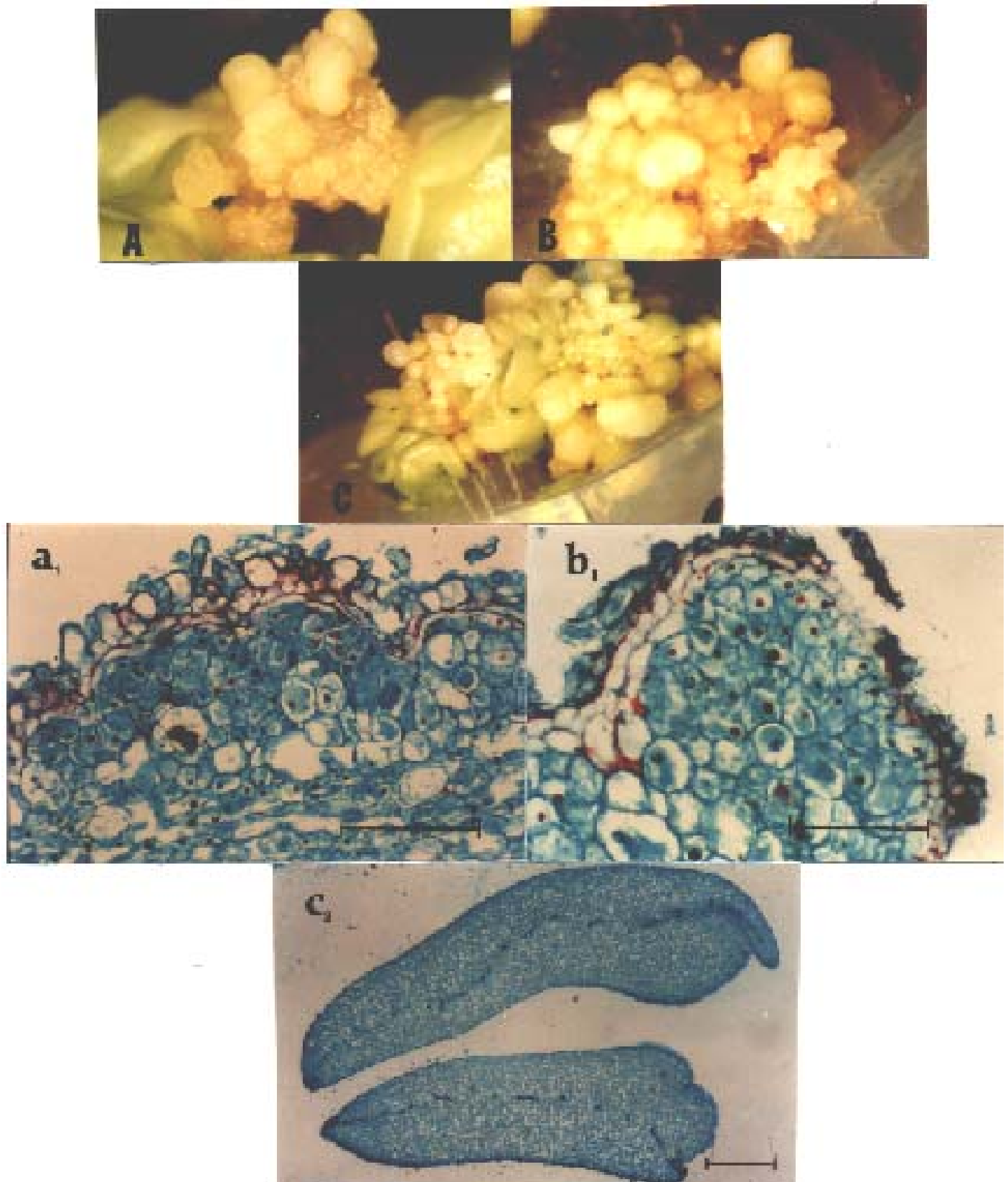


Figura 5. Respuesta *in vitro* (ABC), en la obtención de embriones somáticos a partir de tejido nucelar. Histología (a1, b2, c3) del desarrollo embriogénico celular. Escala = 100  $\mu\text{m}$ . Hasta conformar embriones somáticos = 200  $\mu\text{m}$ . Mandarina 'Mónica' (*Citrus. sinensis* x *C. reticulata*).

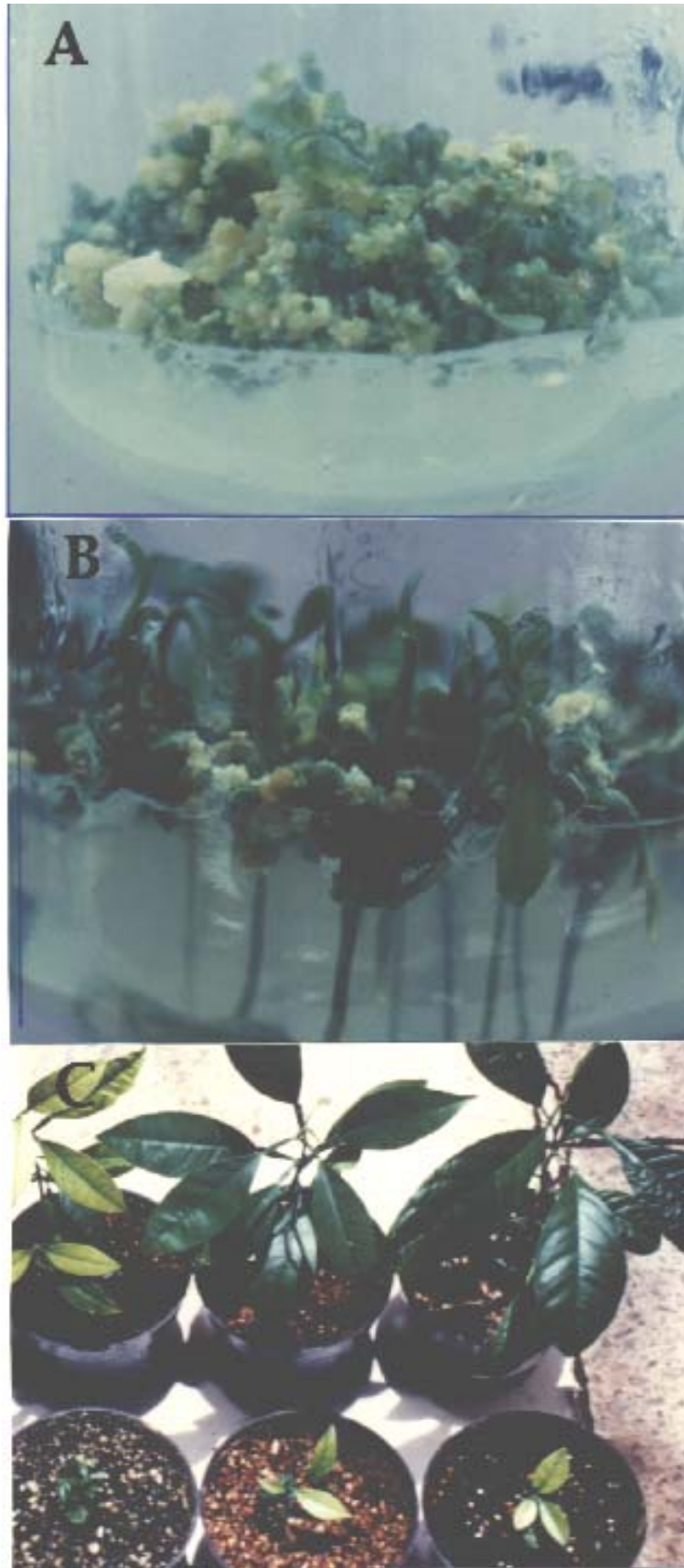


Figura 6. (A) Proliferación in vitro de embriones somáticos obtenidos a partir de tejido nucelar. (B) Enraizamiento de embriones somáticos *in vitro*. (C) Transferencia y adaptación de platas a suelo Mandarina 'Mónica' (*Citrus sinensis* x *C. reticulata*).