

RESPUESTA HISTOLÓGICA A INDUCTORES DE PROCESOS

MORFOGÉNICOS EN *Citrus latifolia* TAN

Adriana Isabel Pérez-Luna, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, Hilda Araceli Zavaleta-Mancera, Alejandrina Robledo-Paz y Gustavo Mora-Aguilera

RESUMEN

En México la citricultura es afectada por plagas y enfermedades, ocasionando daños en la producción. El mejoramiento genético tradicional permitiría obtener materiales resistentes en cítricos; sin embargo, es necesario identificar germoplasma con la resistencia necesaria e identificar el híbrido entre las varias plántulas nucelares que emergen de la semilla. Una alternativa es el desarrollo de cítricos transgénicos resistentes y para ello se requiere un protocolo eficiente de brotación adventicia. En este trabajo se estudian los cambios celulares e histológicos promovidos por precursores de fitoreguladores y activadores de división celular en segmentos internodales de limón persa (*Citrus latifolia*) desde las primeras etapas de morfogénesis hasta la formación de brotes adventicios. Explantes establecidos en medio Murashige y Skoog suplementado con adenina, sulfato de adenina, ácido-4-fluorofenoxiacético

(4-FAA) y triacantanol; fotoperiodo con 16h luz y 30 ±2°C; fueron muestreados para análisis histológico tomando explantes a los 0 (testigo), 10, 20 y 30 días después del establecimiento *in vitro*. El uso de tales compuestos modifica los tejidos del explante. En todos los tratamientos hubo formación de callo parenquimatoso proveniente de divisiones del cambium vascular. Los explantes cultivados en medio con 4-FAA produjeron un callo más pronunciado, con meristemoides formados por células pequeñas con núcleos prominentes y citoplasma denso, con distribución aleatoria. Estos meristemoides son potenciales formadores de brotes adventicios con citocininas y adeninas, respuesta que requiere mayor investigación. Se reporta por primera vez una respuesta morfogénica en limón persa promovida por 4-FAA y adenina, compuestos poco utilizados para la inducción de brotes adventicios en *Citrus spp.*

Introducción

La producción de cítricos se ve afectada por diferentes problemas fitosanitarios causando grandes pérdidas en la producción mundial, por lo que es necesario el uso de tecnologías como ingeniería genética para el desarrollo de variedades comerciales de cítricos resistentes a plagas y enfermedades (Rocha-Peña *et al.*, 1995). En México el limón persa (*Citrus latifolia* Tan.) es un cítrico de gran

importancia comercial, con frutos que se caracterizan por ser de gran tamaño, carentes de semillas, y su mejoramiento genético tradicional se dificulta por carecer de embriones sexuales. Actualmente no se cuenta con un protocolo de regeneración *in vitro* que permita la aplicación de la ingeniería genética para su mejoramiento; uno de los pasos más importantes para la transformación es la obtención de brotes adventicios, por lo que se requiere de un

protocolo de regeneración eficiente (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). En cítricos se han usado segmentos internodales y epicotilos de semillas germinadas *in vitro* como explantes. El uso de los fitoreguladores como bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), isopentiladenina (2iP) y 2,4-ácido diclorofenoxyacético (2,4-D) en el medio de cultivo favorecen la brotación adventicia permitiendo la transformación genética en

diversos genotipos de cítricos, tales como naranja dulce (*Citrus sinensis*), naranjo agrio (*C. aurantium*), citrange (*sweet orange* × trifoliolate orange), limón (*C. limon*), limón mexicano (*C. aurantifolia*) y pomelo (*C. paradisi*) (Gutiérrez-E *et al.*, 1997; Bond and Roose, 1998; Ghorbel *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2004).

En el caso de *C. latifolia*, conocido como limón persa, el establecimiento *in vitro* mediante hipocotilos de

PALABRAS CLAVE / Brotación Adventicia / Callo / Cambium / *Citrus latifolia* / 4-FAA /

Recibido: 04/08/2014. Modificado: 04/04/2015. Aceptado: 08/04/2015.

Adriana Isabel Pérez-Luna.

Ingeniera Bioquímica, Universidad Autónoma de Coahuila, México. Maestría en Ciencias en Fruticultura, Colegio de Postgraduados, México. Investigador, INIFAP, México.

María Alejandra Gutiérrez-Espinosa.

Licenciatura en Agronomía, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México. Maestría en Ciencias en Fruticultura,

COLPOS, México. Ph.D., University of Florida, EEUU. Profesora Investigadora. Colegio de Postgraduados. Dirección: Posgrado en Fruticultura, COLPOS. Km 36.5 carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco. Estado de México C.P.56230. e-mail: alexge@colpos.mx

Hilda Araceli Zavaleta-Mancera.

Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma

Metropolitana-Iztapalapa, México. Maestría en Ciencias en Botánica, COLPOS, México. Ph.D., University of Wales, RU. Profesora Investigadora, COLPOS, México.

Alejandrina Robledo Paz.

Licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Maestría en Ciencias en Genética, COLPOS, México. Doctorado

en Ciencias, CINVESTAV-IPN Irapuato, México. Profesora Investigadora. COLPOS, México.

Gustavo Mora Aguilera.

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo, Universidad Autónoma de Chapingo, México. Maestría en Ciencias en Fitopatología, COLPOS, México. Ph.D., University of Florida, EEUU. Profesor Investigador, COLPOS, México.

HISTOLOGICAL RESPONSE TO INDUCERS OF MORPHOGENETIC PROCESSES IN *Citrus latifolia* TAN

Adriana Isabel Pérez-Luna, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, Hilda Araceli Zavaleta-Mancera, Alejandrina Robledo-Paz and Gustavo Mora-Aguilera

SUMMARY

In Mexico, citrus fruit crops are affected by plague and diseases leading to yield decrease. The traditional genetic improvement would allow to obtain resistant materials in citrus; however, it is necessary to identify germplasm with the needed resistance and to identify the hybrid among the nucellar seedling emerging from the seed. An alternative is the development of resistant transgenic citrus and to this end an efficient adventitious shoot formation protocol is required. In this work the cellular and histological changes promoted by phytohormone and cell division activator precursors are studied in internodal segments of adventitious shoots of Persian lemon (*Citrus latifolia*), from the first stages of morphogenesis to the formation of adventitious shoots. Explants established in Murashige y Skoog medium added with adenine, adenine sulphate, 4-fluorofenoxiacetic acid

(4-FAA) and triacontanol; photoperiod of 16h light and 30 \pm 2°C; were sampled for histological analysis taking explants at 0 (control), 10, 20 and 30 days after in vitro establishment. The use of such compounds modifies the tissues of the explants. There was parenchymatous callus formation in all treatments, stemming from vascular cambium divisions. The explants kept in medium, with 4-FAA produced a more pronounced callus, with meristemoids formed by small cells with prominent nuclei and dense cytoplasm, with random distribution. These meristemoids are potential sources of adventitious shoots with cytokinins and adenines, a response that requires of further study. A morphogenetic response promoted by 4-FAA and adenine, compounds rarely used for adventitious shoot induction in *Citrus* spp. is reported for the first time.

RESPOSTA HISTOLÓGICA A INDUTORES DE MORFOGÊNESE EM *Citrus latifolia* TAN

Adriana Isabel Pérez-Luna, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, Hilda Araceli Zavaleta-Mancera, Alejandrina Robledo-Paz e Gustavo Mora-Aguilera

RESUMO

No México a citricultura é afetada por pragas e enfermidades, ocasionando danos na produção. O melhoramento genético tradicional permitiria obter materiais resistentes em cítricos; no entanto, é necessário identificar germoplasma com a resistência necessária e identificar o híbrido entre as várias plântulas nucelares que emergem da semente. Uma alternativa é o desenvolvimento de cítricos transgênicos resistentes e para isto se requer um protocolo eficiente de brotação adventícia. Neste trabalho se estudam as mudanças celulares e histológicas promovidas por precursores de fitorreguladores e ativadores de divisão celular em segmentos internodais de limão persa (*Citrus latifolia*) desde as primeiras etapas de morfogênese até a formação de brotações adventícias. Explantes estabelecidos em meio Murashige e Skoog suplementado com adenina, sulfato de adenina, ácido-4-fluorofenoxiacético (4-FAA) e triacontanol;

fotoperíodo com 16h luz e 30 \pm 2°C; foram amostrados para análise histológica tomando explantes aos 0 (testemunho), 10, 20 e 30 dias depois do estabelecimento in vitro. O uso de tais compostos modifica os tecidos do explante. Em todos os tratamentos houve formação de calo parenquimatoso proveniente de divisões do câmbio vascular. Os explantes cultivados em meio com 4-FAA produziram um calo mais pronunciado, com meristemóides formados por células pequenas com núcleos proeminentes e citoplasma denso, com distribuição aleatória. Estes meristemóides são potenciais formadores de brotações adventícias com citocininas e adeninas, resposta que requer maior investigação. É relatada por primeira vez uma resposta morfogênica em limão persa promovida por 4-FAA e adenina, compostos pouco utilizados para a indução de brotes adventícios em *Citrus* spp.

semilla no es posible y la obtención de brotes adventicios mediante segmentos internodales, además de presentar una excesiva contaminación por hongos y bacterias *in vitro*. Los protocolos que funcionan para otros cítricos no funcionan para *C. latifolia*. Los inductores de la brotación adventicia tales como adenina, sulfato de adenina, triacontanol y ácido-4-fluorofenoxiacético (4-FAA) han favorecido organogénesis adventicia en *Picrorhiza scrophulariflora*,

Cichorium intybus L., *Bixa orellana*, *Costus speciosus*, *Salvia officinalis*, *Arachis hypogaea*, *Malus domestica*, *Cerasus fruticosa*, *Ipomea batatas*, *Phragmites communis*, *Allium cepa* (Tanikawa *et al.*, 1996; Tanikawa *et al.*, 1998; Tantos *et al.*, 2001; Malaabadi *et al.*, 2005; Grzegorzczuk *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006; Nandagopal and Ranjitha 2006; Bantawa *et al.*, 2009; Parimalan *et al.*, 2009; Kamata *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012),

pero en cítricos no se conoce el efecto de estos inductores. Estudios histológicos realizados en algunos cítricos (*Citrus sinensis*, Troyer citrange y Carrizo citrange) reportan modificaciones en los tejidos del explante, particularmente en el cambium vascular (García-Luis *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Tavano *et al.*, 2009). Bajo el supuesto de que hay inductores de la brotación no probados en *C. latifolia*, en el

presente trabajo se estudian los cambios histológicos y morfogénicos inducidos por adenina, sulfato de adenina, 4-FAA y triacontanol en segmentos internodales de *C. latifolia* provenientes de campo.

Materiales y Métodos

Muestreo de material vegetal y establecimiento in vitro

En los meses de marzo y abril de 2012 (primavera) se colectaron varetas jóvenes de

árboles adultos (10 años) de limón persa de las localidades de Las Palmas, Nayarit (21°40'N, 105°19'O) y Martínez de la Torre, Veracruz (20°02'N, 97°05'O), México. Se retiraron espinas y hojas, se lavaron con agua y jabón antibacterial líquido (salvo®), y posteriormente se probaron tres compuestos para la desinfección: Kasumin® (1ml·l⁻¹), Preservative for Plant Tissue Culture Media (PPM®) (1ml·l⁻¹) y Agry-Gent Plus® (0,5g·l⁻¹) por 12h. Las varetas se disecaron en segmentos de 5cm y se desinfectaron con etanol 70% en agitación (250rpm) por 3min, una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex®) al 20% (v/v) durante 20min en agitación (250rpm) y, finalmente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se establecieron segmentos internodales de 1cm, un segmento por tubo de ensayo, con el extremo basal en contacto con el medio de cultivo base (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con tiamina HCl 2mg·l⁻¹; piridoxina HCl 2mg·l⁻¹; glicina 0,4mg·l⁻¹; ácido nicotínico 1mg·l⁻¹; mioinositol 100mg·l⁻¹; pantotenato de calcio 5mg·l⁻¹; PPM 1mg·l⁻¹; 3% de sacarosa y 0,7% de agar-agar (Merk), ajustando el pH a 5,7 con NaOH 1M. Se probaron cuatro tratamientos que fueron adicionados al medio base: a) 0,2 mg·l⁻¹ ácido-4-fluorofenoxiacético (4-FAA); b) 100mg·l⁻¹ adenina; c) 100mg·l⁻¹ sulfato de adenina; y d) 4,9mg·l⁻¹ triacontanol, 2mg·l⁻¹ BAP y 0,0089mg·l⁻¹ AIA. Los explantes establecidos se colocaron en un cuarto de incubación a 30 ±2°C con fotoperiodo de 16h de luz (blanca, fría y con una intensidad lumínica de 35-50µmol·m⁻²·s⁻¹). Los subcultivos se realizaron cada 30 días. Se establecieron explantes procedentes de Nayarit y Veracruz con 100 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un explante.

Análisis histológico

Se muestrearon tres segmentos internodales por tratamiento, 10 días después del

establecimiento (DDE) de cada experimento. Cada explante se cortó longitudinalmente para obtener dos mitades con una navaja doble filo y se fijaron por 48h en solución FAA (10% formaldehído, 50% etanol, 5% ácido acético glacial y 35% agua). Se deshidrató gradualmente en etanol y xileno, y se incluyó en parafina. En un fragmento de cada explante se realizaron cortes longitudinales y en el otro fragmento cortes transversales, de 15µm, con un microtomo rotatorio (American Optical modelo 820).

Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina 'O' salina (0,05% safranina 'O', 2% NaCl y agua) y verde fijo FCF (0,12% de verde fijo FCF en etanol 95%) según Zavaleta *et al.* (2003). Las observaciones se realizaron en un microscopio Axioscop 2 Plus con cámara Axicam Mrc 5 (Carl Zeiss, Alemania).

De las preparaciones obtenidas se eligieron 2 laminillas por cada repetición para un total de 16 cortes. Con la finalidad de analizar diferentes regiones del explante, se estudiaron cortes discontinuos identificados por su posición en 3, 7, 11 y 15, y se estandarizó el análisis de dos campos visuales por corte, analizando un total de 60 cortes y 120 campos visuales por tratamiento por experimento.

Variables evaluadas

Las variables histológicas evaluadas fueron 14: 1) ancho de xilema secundario interfascicular, medida desde cambium vascular hasta el elemento traqueal más interno de la región interfascicular (AXIF); 2) ancho de xilema fascicular (primario más secundario), medido desde cambium vascular hasta el elemento traqueal más interno del xilema primario (AXF); 3) número de elementos traqueales en xilema fascicular, medidos desde cambium vascular hasta el último elemento traqueal en la zona vascular (TXF); 4) ancho de floema, desde las fibras de floema

primario hasta cambium vascular (AF); 5) ancho de corteza externa, medido desde la epidermis hasta las fibras de floema primario (AC); 6) diámetro de elementos traqueales de xilema fascicular, células de vasos seleccionadas al azar (DTXF); 7) diámetro de células de corteza, células de parénquima seleccionadas al azar en la zona media de la corteza (DCC); 8) diámetro de células de médula, células de médula seleccionadas al azar en la zona próxima al xilema (DCM); y 9) brotes adventicios, identificación de meristemos y trazas foliares en la periferia del corte (BA). Para cortes longitudinales las variables evaluadas fueron: 10) ancho de corteza, medido desde la epidermis hasta floema, en la parte superior del corte (AC), 11) índice de dilatación del cambium y floema, medido desde el cambium a las fibras de floema en la parte distal del explante (DCF); 12) altura de callo, tejido que sobresale del explante, el cual fue medido desde la superficie del corte hasta el punto más alto del callo (AlCa); 13) meristemoides, conjunto de células pequeñas agrupadas, con alta actividad mitótica, con núcleos prominentes y citoplasma denso (M) y 14) meristemos en fila, células en fila, resultado de divisiones perpendiculares al eje longitudinal del explante (MF). Se utilizó el analizador de imágenes AxionVision Le Rel 4.3.

En aquellas variables donde se requirió medir células individuales (diámetro de elementos de vaso, corteza y médula) se tomaron tres medidas por campo visual.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron analizadas estadísticamente, excepto los meristemos en fila, que son variables cualitativas. Para el análisis las variables (excepto altura de callo y puntos meristemáticos) fueron sometidas a una homogenización de datos, para asociar los cambios al efecto del compuesto utilizado independientemente

del tamaño inicial del explante; para ello se eliminaron máximos y mínimos en cada repetición. El resto de los valores (µm) se dividieron entre ¼ de diámetro del explante (µm), se promediaron los datos y se diseñó una matriz que fue analizada mediante el paquete estadístico SAS System versión 9.0 bajo un diseño experimental completamente al azar (ANOVA). Por lo anterior, los resultados están expresados en términos relativos. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Adicionalmente se realizó un análisis de correlación mediante el coeficiente de correlación de Pearson y se calculó el área bajo la curva de las variables ancho de floema, índice de dilatación de tejido vascular, altura de callo y formación de regiones meristemoides. El índice de dilatación de tejido vascular se calculó con la relación del DCF distal entre el DCF basal.

Resultados

Respuesta morfogénica de los explantes

Todos los tratamientos dieron origen a la formación de callo entre los 10 y 20 DDE en ~75% de los explantes establecidos en los tratamientos con adenina, sulfato de adenina y triacontanol. El callo fue turgente, compacto y de color verde rodeando la médula del explante (Figura 1A-C). Con el tratamiento de 4-FAA el callo se formó desde los 10 DDE en el 90-100% de los explantes, cubriendo totalmente la superficie de corte y dando origen a un callo de mayor tamaño con respecto al resto de los tratamientos, turgente, color verde o blanco y de apariencia compacta (Figura 1D).

Análisis histológico

La estructura original del explante (día 0) está caracterizado por una epidermis uniestratificada formada por células pequeñas, cristales (drusas) subepidérmicos, una corteza de 20-23 estratos de células

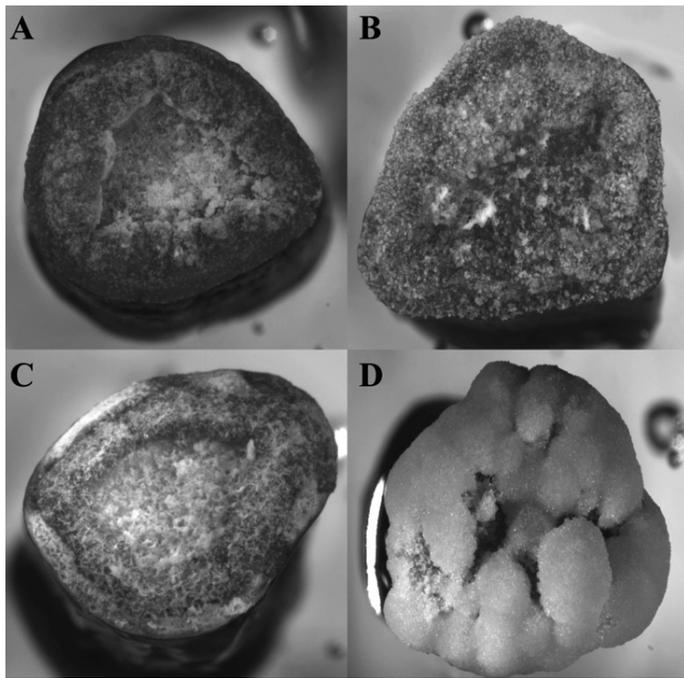


Figura 1. Formación de callos en segmentos internodales de limón persa a los 20 DDE en medio MS bajo el efecto de A: triacantanol, B: sulfato de adenina, C: adenina, y D: 4-FAA.

parenquimáticas muy vacuoladas y espacios intercelulares con glándulas oleaginosas de distribución aleatoria. El explante presentó crecimiento secundario con la presencia de un cilindro vascular continuo, un cambium vascular, xilema y floema secundario. El floema primario estuvo caracterizado por la presencia de paquetes de fibras (Figura 2). El xilema secundario estuvo compuesto elementos de vaso y fibras, ocupando un diámetro $400 \pm 58 \mu\text{m}$ en corte transversal. Las células de la médula fueron de parénquima poliédricas, con algunos espacios intercelulares y de gran tamaño (2,04) en la parte central (Figura 2B). En cortes longitudinales se observaron los mismos tejidos, pero se corroboró la forma isodiamétrica de las células de la corteza y médula (Figura 2C).

La repuesta morfogénica se inició en todos los tratamientos a los 10 DDE. Los principales cambios estructurales observados en el medio suplementado con $0,2 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 4-FAA (Figura 2D-F) se localizaron en la zona del cambium vascular, en donde se

identificó un aumento en el número de capas celulares debido a las divisiones tangenciales en el meristemo, produciendo una dilatación en la zona del floema, región de la cual se formó tejido de callo que se extendió sobre el explante (Figura 2F). El aumento del tamaño del callo se produjo a partir de divisiones anticlinales de la corteza. El xilema y la médula no parecen contribuir a la formación de callo.

Con el tiempo los cambios histológicos aumentaron; en la zona del cambium continuaron las divisiones periclinales, ocasionando engrosamiento en esta región (18 a 24 capas de células), hubo mayor dilatación del tejido vascular y aumento en el tamaño del callo. Todos los tratamientos indujeron la formación de callo. El tratamiento que promovió los mayores cambios celulares fue 4-FAA (Figura 2E, F), en el cual también se observó actividad mitótica en la región cortical, principalmente en la región cercana al floema, promoviendo un aumento de tamaño del callo. Dentro de los cambios más importantes

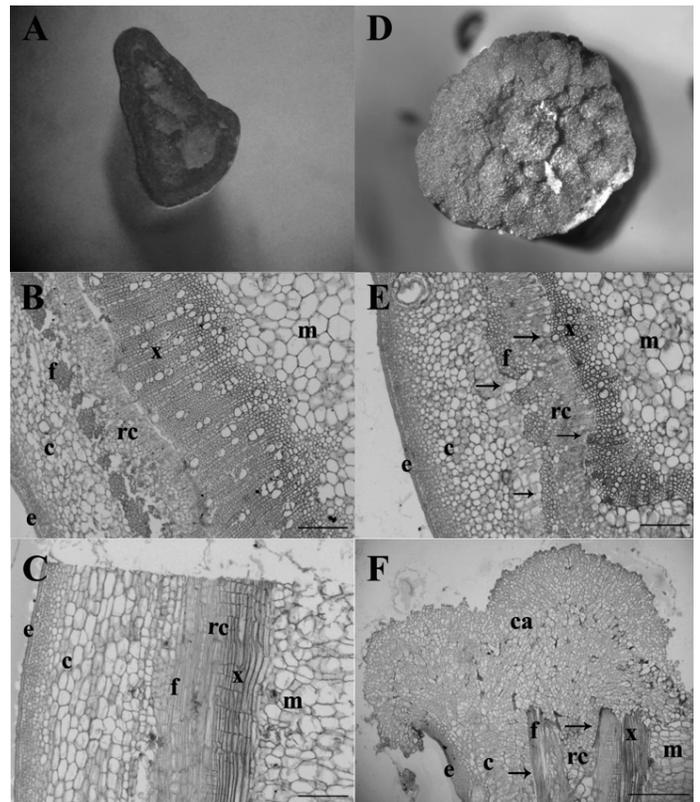


Figura 2. Segmentos internodales de *Citrus latifolia*, usado como explante para la inducción de organogénesis a los 0 (A-C) y 20 DDE en medio MS suplementado con $0,2 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 4-FAA (D-F). Vista general de los explantes (A, D), cortes transversales (B, E) y cortes longitudinales (C, F). En E y F se aprecia aumento en el número de capas celulares (flechas) en la región del cambium y corteza interna, los cuales dieron origen a la formación de callo (F). El xilema y médula no mostraron cambios. e: epidermis, c: corteza, f: floema, rc: región del cambium, x: xilema, m: médula y ca: callo. Barras= $200 \mu\text{m}$.

inducidos por 4-FAA estuvo la formación de meristemoides a partir de los 20 DDE, distribuidos predominantemente (70%) en la periferia del callo (Figura 3). Los meristemoides son agrupamientos concéntricos de células meristemáticas de forma isodiamétrica, paredes delgadas, núcleos

prominentes y citoplasma denso. Los meristemoides también se identificaron en los tratamientos de sulfato de adenina y adenina pero en menores porcentajes (1-2%). El aumento de tamaño del callo en altura se debió principalmente a la diferenciación de meristemos en fila provenientes de la

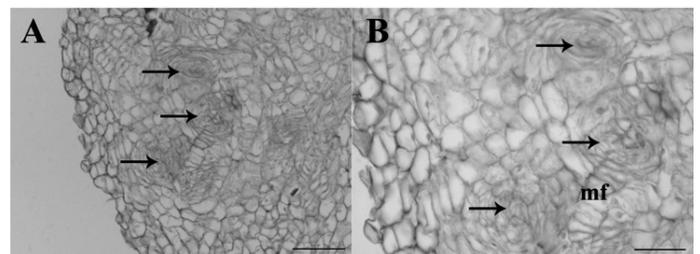


Figura 3. Regiones meristemoides en el callo producido con 4-FAA a los 20 DDE, donde se muestra la formación de regiones meristemoides (flechas) y meristemos en fila (mf). Barras= $100 \mu\text{m}$ (A) y $50 \mu\text{m}$ (B).

región del cambium, con predominio de divisiones tangenciales sucesivas que formaron hileras (Figura 3). Es sabido que la brotación adventicia es el resultado de la interacción de varios factores (Marques *et al.*, 2011); en el presente trabajo se logró la formación de un brote en el tratamiento de adenina a los 20 DDE, proveniente de células meristemáticas del cambium; el nuevo brote desarrolló un meristemo apical y primordios foliares sin una diferenciación clara de tejido vascular (Figura 4).

A los 30 DDE en el tratamiento de 4-FAA, continuó el aumento el volumen del callo por meristemos en fila, dilatación de la región del cambium y floema, y aumento en el número de regiones meristemoides.

Con la finalidad de evaluar los cambios estructurales promovidos por los compuestos usados en el presente estudio se analizaron 14 variables cuyos resultados se muestran en la Tabla I. Las variables que mostraron diferencias estadísticas fueron: ancho relativo de floema, índice de dilatación de tejido vascular, altura de callo y formación de regiones meristemoides. Estas variables indican una

respuesta morfogénica al tratamiento.

Las cuatro variables involucradas con la morfogénesis adventicia mostraron un incremento en sus valores conforme transcurrían los días de evaluación. Se identificó una correlación positiva entre las variables de ancho de floema (AF) e índice de dilatación del cambium y floema (DCF), mientras que en el resto de las variables no se encontraron correlaciones significativas.

Con la finalidad de identificar el mejor tratamiento en las variables ancho de floema, índice de dilatación del tejido vascular y altura de callo, se realizó un análisis de área bajo la curva (ABC), el cual consiste en la incorporación de todos los datos mediante un análisis en el tiempo, que arroja como resultado una gráfica en la que se generan diferentes áreas bajo la curva correspondientes a cada tratamiento. De acuerdo a este análisis los mejores tratamientos para las variables evaluadas fueron sulfato de adenina y 4-FAA. El sulfato de adenina modificó significativamente ($\alpha=0,05$) el ancho relativo del floema en los explantes de Veracruz, y el 4-FAA modificó significativamente ($\alpha=0,05$) el índice de dilatación de

tejido vascular (Veracruz) y la altura de callo (Nayarit y Veracruz). Referente a la variable de regiones meristemoides ésta solo se presentó en el tratamiento con 4-FAA.

Discusión

El interés en inducir morfogénesis adventicia radica en que es uno de los principales factores limitantes que previene el desarrollo de tecnologías de transformación genética empleando *Agrobacterium tumefaciens* y otros medios de transferencia de genes, ya que se requiere de células en desarrollo para integrar el ADN foráneo en el genoma de la especie en cuestión. Tomando en cuenta la importancia de generar cítricos resistentes a plagas y enfermedades mediante ingeniería genética, se ha obtenido brotación adventicia con semillas de cítricos tales como el naranjo dulce y citrange (Bond y Roose, 1998; Yu *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2004), el naranjo agrio (Gutiérrez *et al.*, 1997; Ghorbel *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2004; Román *et al.*, 2005), pomelo, volkameriano y alemow (Palacios *et al.*, 2004; Román *et al.*, 2005; Febres *et al.*, 2007) y limón mexicano (Román *et al.*,

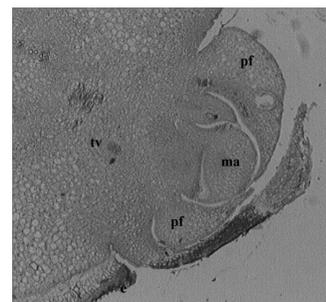


Figura 4. Corte transversal de brote adventicio de limón persa a los 20 DDE en medio MS suplementado con adenina a 100mg·l⁻¹. e: epidermis, tv: tejido vascular, ma: meristemo apical, flechas: primordios foliares.

2005; Loeza *et al.*, 2011; Soler *et al.*, 2012). En los trabajos mencionados los brotes adventicios se obtuvieron de plántulas provenientes de la germinación *in vitro* de semillas. En naranjo Washington Navel, Bond y Roose (1998) usan los embriones del 1% de la población de plantas que presentan semillas.

La regeneración de plántulas está influenciada por la especie, el genotipo, el explante, la planta madre de la que se obtiene el explante, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento (concentración e interacción), las condiciones de crecimiento

TABLA I
EFECTO DE ADENINA (A), TRIACONTANOL (T), SULFATO DE ADENINA (SA)
Y 4-FAA EN EXPLANTES DE LIMÓN PERSA DE DOS PROCEDENCIAS

Variables	Nayarit (marzo)					Veracruz (abril)				
	Tes	A	T	SA	4-FAA	Tes	A	T	SA	4-FAA
AXIF *	7,2 a	7,7 a	12,7 a	7,9 a	7,3 a	12,5 a	7,9 a	8,2 a	12,7 a	6,8 a
AXF *	12,3 a	12,9 a	18,5 a	13,0 a	12,0 a	19,0 a	12,6 a	11,5 a	16,0 a	11,8 a
TXF *	0,8 a	0,9 a	1,2 a	0,8 a	0,7 a	1,2 a	0,7 a	0,7 a	1,0 a	0,7 a
AF *	11,7 a	17,0 a	14,7 a	16,8 a	13,5 a	11,5 b	11,9 b	20,7 b	25,0 a	11,7 b
AC *	20,1 a	27,6 a	26,4 a	24,4 a	24,0 a	20,6 a	20,4 a	26,5 a	21,5 a	22,3 a
DTXF *	1,7 a	2,1 a	2,00 a	1,7 a	1,5 a	1,9 a	1,7 a	1,7 a	2,0 a	1,6 a
DCC *	2,2 a	2,8 a	2,8 a	2,6 a	1,8 a	2,5 a	2,3 a	2,6 a	2,1 a	1,8 a
DCM *	2,5 a	3,1 a	2,9 a	3,0 a	2 a	2,8 a	2,8 a	3,1 a	2,5 a	2,4 a
BA **	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A
AC *	24,2 a	28,3 a	30,2 a	28,4 a	27,4 a	32,6 a	20,9 a	28 a	24,8 a	20,4 a
DCF *	1,1 c	1,4 a b	1,3 a b	1,2c	1,4 a	1,2 b	1,4 b	1,7 b	1,4 b	2,1 a
AlCa	-	141,8 b	313,7 a b	44,9c	843,4 a	-	342,9 b	419,0 b	404,1 b	757,4 a
M *	-	0,1 b	0,0 b	0,1 b	7,4 a	-	0,0 b	0,0 b	0,0 b	7,6 a
MF **	A	A	A	A	P	A	A	A	A	P

* Variables que representan el promedio de 240 cortes. AXIF: ancho de xilema secundario interfascicular, AXF: ancho de xilema fascicular, TXF: número de elementos traqueales en xilema fascicular, AF: ancho de floema, AC: ancho de corteza externa, DTXF: diámetro de elementos traqueales de xilema fascicular, DCC: diámetro de células de corteza, DCM: diámetro de células de médula, BA: brotes adventicios, AC: ancho de corteza, DCF: índice de dilatación del cambium y floema, AlCa: altura de callo, M: meristemoides, MF: número de meristemos en fila.

** Variables cualitativas donde A: ausencia y P: presencia.

Valores con letras distintas en una fila son estadísticamente diferentes ($\alpha=0,05$).

(temperatura, fotoperiodo). En resumen, el fenómeno es multifactorial, por lo que definir el protocolo de laboratorio requiere tiempo. Petri *et al.* (2005) mencionan que los árboles frutales son de los más recalcitrantes en producir brotes adventicios; estos autores desarrollaron un protocolo con hojas de durazno empleando pulsos y diferentes días de exposición en ANA y 2,4-D, en interacción con las poliaminas putrescina y espermidina e inhibidores de etileno como tiosulfato de plata (STS) y aminoetoxivinil glicina (AVG). En el presente trabajo al establecer segmentos internodales de limón persa *in vitro*, provenientes de árboles maduros de campo, se logró la obtención de brotes adventicios en un bajo porcentaje (1%), aun con el uso de 4-FAA, sulfato de adenina, adenina y triacontanol, compuestos que han promovido exitosamente la organogénesis adventicia en otras especies, como son los casos de *Bixa orellana* (Parimalan *et al.*, 2009), *Picrorhiza scrophulariiflora* P. (Bantawa *et al.*, 2009), *Cichorium intybus* L. (Nan-dagopal and Ranjita, 2006) y *Ipomea batatas* L. (Luo *et al.*, 2006).

Para la regeneración de plántulas a partir de explantes como epicotilos y segmentos internodales se requiere de la interacción de varios factores a fin de inducir una respuesta favorable (Gutiérrez *et al.*, 1997; García-Luis *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2004). Ramesh *et al.*, (2005) afirman que el uso de sulfato de adenina en concentraciones superiores a 80mg·l⁻¹ no induce una respuesta organogénica. En el caso de triacontanol y 4-FAA, la respuesta varía dependiendo de la especie, en algunas especies leñosas el triacontanol logró inducir microplántulas a partir de segmentos nodales (Tantos *et al.*, 2001), mientras que en frijol no promueve ningún cambio (Mukeshimana *et al.*, 2012); en contraste, favorecen la formación de callo y brotación adventicia en *Allium cepa* a partir de semillas en

suspensión e *Ipomea batata* a partir de peciolos (Tanikawa *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2006; Kamata *et al.*, 2011).

En estudios previos en cítricos se ha observado que los brotes adventicios provienen de células parenquimáticas del callo, el cual se origina a partir de intensas divisiones periclinales de la región del cambium en respuesta del estímulo hormonal del medio de cultivo (García-Luis *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006). Estos resultados indican que ante la presencia de ciertos compuestos las células se vuelven competentes y capaces de reaccionar para inducir regeneración y formación de brotes en explantes de naranja dulce y citrange. En forma similar a otros cítricos, en limón persa, la formación de callo en todos los tratamientos fue a partir de divisiones periclinales de células del cambium, debido a la totipotencialidad de estas células, que tienen la capacidad de dividirse e iniciar morfogénesis bajo condiciones de cultivo adecuadas (Peña *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006). Aunque en todos los medios de regeneración probados se observó la formación de callo, fue el tratamiento con 4-FAA y adenina donde se presentó una mayor desdiferenciación y formación de un brote adventicio respectivamente.

Algunos autores mencionan que compuestos de tipo auxínico son prácticamente innecesarios en el medio de cultivo para inducir morfogénesis en cítricos, ya que tiene un efecto marginal comparado con las citocininas, principalmente BAP (García-Luis *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Tavano *et al.*, 2009). Sin embargo en este estudio, en presencia de 4-FAA al que se atribuye un efecto tipo auxina, se identificaron cambios morfogénicos tales como la formación de meristemas en fila que aumentaron el tamaño del callo, regiones meristemoides localizadas y disminución en el tamaño de células de corteza

resultado de la activa división celular. Estas respuestas pudieron estar asociadas al uso de auxinas y citocininas en el medio las cuales, solas o combinadas, pueden inducir cambios celulares y organogénesis adventicia de acuerdo a varios autores (Peña *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012). Otro factor determinante es la concentración de fitohormonas endógenas en sectores específicos (basal) del explante, que actúan sinérgicamente en la formación de callo y brotes adventicios en diferentes especies, jugando un papel muy importante en la competencia de células para la transformación en cítricos (Peña *et al.*, 2004). A los 20 DDE en el medio de cultivo, las células han respondido a la presencia del inductor produciendo regiones meristemoides, por lo que a este tiempo procedería cambiar de medio de cultivo para inducir la brotación.

A los 20 DDE en el medio de cultivo las células respondieron a la presencia de los compuestos precursores de fitohormonas, produciendo regiones meristemoides; sin embargo, estas no lograron diferenciarse en brotes adventicios posiblemente porque hizo falta un estímulo adicional para inducir el cambio en las células. Probablemente, después de los 20 días de que los segmentos internodales permanezcan en presencia de 4-FAA (0,2mg·l⁻¹) sería recomendable cambiarlos a un medio de cultivo que contenga reguladores del crecimiento principalmente citocininas asociadas con la inducción de la brotación.

En limón persa no se había estudiado el uso de inductores de brotación inusuales, como adenina, sulfato de adenina, triacontanol y 4-FAA para inducción de brotes adventicios.

Conclusiones

El estudio histológico y análisis estadístico permitió estudiar y analizar los cambios en células y tejidos, promovidos por 4-FAA, adenina, sulfato de adenina, triacontanol, BAP y AIA en las

concentraciones y combinaciones propuestas, en explantes internodales de *C. latifolia*. Se identificaron cuatro variables involucradas directamente con la morfogénesis: presencia de meristemoides, ancho relativo de floema, índice de dilatación de tejido vascular, altura de callo y formación de regiones meristemoides.

Para futuros trabajos se propone el uso de explantes adicionales como hojas y ápices de árboles jóvenes mantenidos en condiciones controladas de sanidad y nutrición de invernadero.

Este es el primer reporte del uso de adenina y 4-FAA para la inducción de meristemoides y brotes adventicios en explantes internodales de limón persa (*Citrus latifolia*) provenientes de árboles adultos de campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría concedida a la estudiante Adriana Isabel Pérez Luna (312346).

REFERENCIAS

- Almeida WAB, Mourão Filho FAA, Pino LE, Boscaroli RL, Rodríguez APM, Mendes BMJ (2003) Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Sci.* 164: 203-211.
- Almeida WAB, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ, Rodríguez APM (2006) Histological characterization of *in vitro* adventitious organogénesis in *Citrus sinensis*. *Biol. Plant.* 3: 321-325.
- Bantawa POS, Roy, Ghosh P, Mondal TK (2009) Effect of bavistin and adenine sulphate on *in vitro* shoot multiplication of *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell. An endangered medicinal plant of Indo-China Himalayan regions. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 19: 237-245.
- Bond JE, Roose ML (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep.* 18: 229-234.
- Febres V, Lee RF, Moore GA (2007) Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit. *Plant Cell Rep.* 27: 93-104.

- García-Luis A, Bordon Y, Moreira-Dias JM, Molina RV, Guardiola JL (1999) Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. *Ann. Bot.* 84: 715-723.
- Ghorbel R, Domínguez A, Navarro L, Peña L (2000) High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiol.* 20: 1183-1189.
- Grzegorzczak I, Bilichowski I, Mikiciuk-Olasik E, Wysokinska H (2006) The effect of triacontanol on shoot multiplication and production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Acta Soc. Bot. Polon.* 75: 11-15.
- Gutiérrez-E MA, Luth D, Moore GA (1997) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep.* 16: 745-753.
- Kamata Y, Masamura N, Miyazaki A, Nagata T (2011) A novel autofluorescence-based selection of calli amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Biotechnol.* 28: 361-371.
- Lee J, Seo S, Kim B, Woo S, Koo B, Park T, Lim YP, Kim S (2012) Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the reed grass (*Phragmites communis* Trin.). *Afr. J. Biotechnol.* 11: 1904-1911.
- Loeza KE, Gutiérrez EMA, Ochoa MDL, Villegas MA, Mora AG, Palacios TEC, Pérez MBE (2011) Análisis de la resistencia en Pomelo y Limón mexicano transformados con el gen p 25 del Citrus tristeza virus. *Agrociencia* 45: 55-65.
- Luo HR, Santa-Maria M, Benavides J, Zhang DP, Zhang YZ, Ghislain M (2006) Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1851-1857.
- Malabadi RB, Mulgund GS, Nataraja K (2005) Effect of triacontanol on the micropropagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. Using rhizome thin sections. *In vitro Cell. Devel. Biol.* 41: 129-132.
- Marques NT, Nolasco GB, Leitão JP (2011) Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Sci. Hort.* 129: 176-182.
- Mukeshimana G, Ma Y, Walworth AE, Song G, Kelly JD (2012) Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnol. Rep.* 7: 59-70.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nandagopal S, Ranjitha KBD (2006) Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and *in vitro* flowering of *Cichorium intybus* L. cv. Focus - a potent medicinal plant. *Acta Agric. Sloven.* 87: 415-425.
- Palacios TEC, Gutiérrez EMA, Febres VJ, Ochoa MDL, Moore GA, Pérez M-BE, Robles GMM (2004) Genetic transformation of sour orange and alemow with non-translatable CP, p27-CP and 3'end sequences from Citrus Tristeza virus found in Veracruz, Mexico. *16th IOCV Conference*. Short communications, pp. 412-415.
- Parimalan R, Giridhar P, Gururaj HB, Ravishankar GA (2009) Micropropagation of *Bixa orellana* using phytohormones and triacontanol. *Biol. Plant.* 53: 347-350.
- Peña L, Pérez RM, Cervera M, Juárez JA, Navarro L (2004) Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Ann. Bot.* 94: 67-74.
- Pérez-Tornero O, Egea J, Vanoostende A, Burgos L (2000) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Sci.* 158: 61-70.
- Petri C, Albuquerque N, Pérez-Tornero O, Burgos L (2005) Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf tissues. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82: 105-111.
- Ramesh M, Saravanakumar RM, Pandian SK (2005) Benzyl amino purine and adenine sulphate induced multiple shoot and root induction from nodal explants of *Brahmi*, *Bacopa monnieri* (Linn.) Penn. *Nat. Prod. Rad.* 5: 44-51.
- Rocha-Peña MA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa-Corona FM, Garnsey SM, Yokomi RK (1995) Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* 79: 437-445.
- Román RCF, Gutiérrez EMA, Pérez M-BE, Gutiérrez CR, Gómez LMA, Palacios TEC, Robles GMM (2005) Expression of different genes to confer resistance to pathogens in transgenic citrus plants. *16th IOCV Conference*. pp. 392-398.
- Soler N, Plomer M, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2012) Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnol. J.* 10: 597-608.
- Tanikawa T, Takagi M, Ichii M (1996) Plant regeneration from suspension cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Tiss. Cult. Lett.* 13: 259-264.
- Tanikawa T, Takagi M, Ichii M (1998) Varietal differences in plant regeneration from solid and suspension cultures in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Tiss. Cult. Lett.* 13: 259-264.
- Tantos A, Mészáros A, Farkas T, Szalai J, Horváth G (2001) Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Rep.* 20: 16-21.
- Tavano ECR, Stipp LCL, Muniz FR, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ (2009) *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biol. Plant.* 53: 395-399.
- Verma A, Malik CP, Gupta VK, Bajaj BK (2011) Effects of *in vitro* triacontanol growth antioxidant enzymes, and photosynthetic characteristics in *Arachis hypogaea* L. *Braz. Soc. Plant Physiol.* 23: 271-277.
- Yu C, Huang S, Chen C, Deng Z, Ling P, Gmitter FGJr (2002) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 147-155.
- Zavaleta MHA, Hernández VMS, Cuevas SJA, Engleman EM. (2003) Anatomía de la semilla de *Cupania dentata* (Sapin-daceae) con énfasis en la semilla madura. *Anal. Inst. Biol. UNAM, Ser. Bot.* 74: 17-29.