

EVALUACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS Y MEDIOS DE SOPORTE, PARA LA MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS TOLERANTES A LA TRISTEZA

EVALUATION OF DIFFERENT SOURCES OF CARBOHYDRATES AND MEDIUM OF SUPPORT FOR THE *in vitro* MULTIPLICATION OF ROOTSTOCK TOLERANT TO CITRUS TRISTEZA VIRUS

María de Jesús Martínez-Hernández*, Alejandro Alonso López**, Francisco Osorio-Acosta**, Felipe Gallardo López**, Héctor López Moctezuma* y Martín Mata Rosas***

*Investigadores. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas. E-mail: mhernandezmj@gmail.com.

**Investigadores. Colegio de Postgraduados. Campus Veracruz, México

*** Investigador. Inecol. México.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de los azúcares xilosa, fructosa y 10X20F como sustitutos de la sacarosa en el número y altura de los brotes (AB), número de hojas (NH), número de raíces (NR) por brote, número de brotes enraizados de los portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y C-35. Además, se comparó la vermiculita y el agar como medio de soporte. En la formación de brotes se pudo observar que existió un promedio de 2 brotes por explante en las 3 especies con todas las fuentes de carbohidratos. Por otro lado, la AB, NH por brote y NR en ambos medios utilizados, no mostraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$); observándose un mayor porcentaje de brotes enraizados cuando se utilizó sacarosa y 10X20F en ambos medios de cultivo (99-100%). En relación a los tratamientos con xilosa y fructosa se presentó una respuesta del 75-89% de enraizamiento. Los resultados mostraron que no hubo diferencias en la multiplicación en cuanto a la fuente de carbohidratos ni al medio de soporte utilizado, pero la AB fue mayor en el portainjerto *C. volkameriana*.

Palabras Clave: Portainjertos; cítricos; cultivo de tejidos; azúcares; vermiculita.

SUMMARY

The use of the sugars xylose, fructose and 10X20F, as substitutes for sucrose, was evaluated in terms of effects on the number and height of shoots, number of leaves, roots per shoot, and rooting shoots in rootstocks of the Citrus "tristeza" virus (CTV) resistant lemon varieties *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* and C-35. The explants were cultured in vermiculite and in agar in order to concurrently compare the effects of these different culture media. An average of two shoots per explant was observed in all three species in all three carbohydrate treatments. Shoot height, number of leaves per shoot and number of roots in both culture media, were not found to be significantly different ($P < 0.05$). A higher percentage of rooting shoots was observed in the sucrose and 10X20F treatments in both culture media (99-100%). Treatments utilising xylose and fructose showed a response of 75-89% rooting. The results showed that neither carbohydrate source nor culture medium had a significant effect on *in vitro* multiplication, but that shoot height was higher in the rootstock of *C. volkameriana*.

Key Words: Rootstocks; citrus; tissue culture; sugars; vermiculite.

RECIBIDO: febrero 17, 2009

ACEPTADO: junio 08, 2009

INTRODUCCIÓN

La citricultura es una actividad importante en el estado de Veracruz, representa casi el 50% del total nacional, con 205 mil hectáreas plantadas con una producción de 2,78 millones de toneladas anuales, generando 32 mil empleos directos y 97 mil indirectos en la industrialización y comercialización de sus productos, generando 3 mil 832 millones de pesos (FAO, 2005).

Los cítricos que crecen en climas tropicales se ven afectados por diversas plagas y enfermedades, algunas de estas causadas por virus; siendo la tristeza una de las enfermedades más destructiva que se conoce. Debido a esta enfermedad se han eliminado millones de árboles injertados sobre naranjo agrio, *Citrus aurantium* L. Osbeck, en otras regiones cítricas importantes del mundo, tales como Argentina, Brasil, España, Estados Unidos y Venezuela (Gutiérrez, 1996; Orozco-Santos, 1996).

En Veracruz, México, se está realizando un programa de diversificación productiva y la creación del biocampo, con el uso responsable de la biotecnología que incluye la reconversión de 30 millones de árboles tolerantes al VTC y mayor transferencia de tecnología (SAGARPA, 2007). Esto es porque se ha encontrado VTC tanto en viveros como en huertas comerciales donde se ha utilizado como portainjerto naranjo agrio, en ambos casos fueron eliminados los árboles afectados. Además de la amenaza que representa la presencia del pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* Kirkaldy.

En este sentido, es necesaria la propagación de patrones tolerantes, mediante técnicas de cultivo que garanticen la producción masiva de plantas libres de patógenos (Padrón, 2000; Murcia *et al.*, 2002). La multiplicación *in vitro* de especies de interés, es una alternativa que asegura la obtención de brotes de buena calidad con un adecuado sistema radical, garantizando el éxito de plantas libres de patógenos y su inmediata adaptación a las nuevas condiciones ambientales (Medina-Urrutia y Valdez-Verduzco, 1990; Singh, 2002; Cervera *et al.*, 2004).

El medio de cultivo *in vitro* contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, una fuente de carbohidratos, ácidos orgánicos y otros compuestos; además de utilizar un soporte para los explantes, esto asegura el buen desarrollo de las plantas. El tipo y concentración de fuente de carbono son notablemente variadas dependiendo del objetivo de la investigación, por ejemplo: propagación masiva de especies, sanea-

miento de plantas, cultivo de callos, embriogénesis, organogénesis y cultivo de cloroplastos (Chu y Figueiredo-Ribeiro, 2002; García *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Gollagunta *et al.*, 2004; Slesak *et al.*, 2004).

La baja actividad fotosintética y la pequeña área foliar de los explantes, en condiciones *in vitro*, no proporcionan cantidades suficientes de carbohidratos; por lo que los elementos minerales y compuestos orgánicos del medio son esenciales (Ruzéicã *et al.*, 2000). Así la utilización de la sacarosa es muy importante en el medio de cultivo y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro* (Simoes *et al.*, 1990; Zimmerman, 1995;). Como fuente de carbono en el medio de cultivo se pueden utilizar la glucosa, galactosa, manitol, sorbitol, maltosa y la fructosa. Sin embargo, Cárdenas y Villegas (2002) mencionan que al aumentar la concentración de sacarosa a 90 mM al medio de cultivo el potencial osmótico se vuelve negativo 0-39 MPa impidiendo la absorción del agua. Por lo tanto, la respuesta de la especie vegetal depende de la fuente de carbono y los macronutrientes utilizados en el medio de cultivo. El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de xilosa (X), fructosa (F) y 10X20F y vermiculita como sustrato inerte como sustituto del agar en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de los portainjertos: *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35 (C- 35).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS; 1962), adicionándole en la etapa de multiplicación bencilaminopurina (BAP) 1 mg l⁻¹. En el enraizamiento se diluyeron las sales inorgánicas MS al 50%, 2,5 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y vitaminas (Myo-inositol 0,1 mg l⁻¹, Thiamine 0,1 mg l⁻¹ y Pyridoxine 0,5 mg l⁻¹). Como medio de soporte se utilizó agar (Sigma®) 6 g l⁻¹ y vermiculita (SINSEMILLLA STREET 3L). El medio se ajustó a pH 5,8 con KOH1N y/o HCl1N antes de adicionar el agar y la vermiculita, se esterilizó en la autoclave a 120 °C durante 20 minutos. De acuerdo a la metodología de Kataoka (1994), la vermiculita se tamizó con el objetivo de obtener un diámetro de granos de 2,4 a 5 mm. Colocándose 25 ml de vermiculita y 20 ml del medio de cultivo en un frasco de vidrio de una capacidad de 120 ml. Como fuente de carbono se utilizó xilosa 10 g l⁻¹, fructosa 20 g l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹ y la combinación de xilosa y fructosa (10X20F g l⁻¹).

Las semillas de los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, se obtuvieron de árboles con buena

producción y certificados libres de virus. Se eliminaron los tegumentos de las semillas, y se desinfectaron por inmersión durante 1 min, en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 2,5% más 2 gotas de Tween 20; se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se pusieron a germinar en el medio de cultivo. Una vez obtenidas las plántulas *in vitro* se procedió a cortar segmentos nodales de 1 cm de longitud, de cada uno de los portainjertos, se desinfectaron por inmersión durante 1 min en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 2,5%, más 2 gotas de Tween 20; se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. La preparación y posterior cultivo de los mismos se realizó bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar. En cada frasco con medio de cultivo se colocaron 3 segmentos cultivándose a una temperatura de 25 °C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3X4X2, (portainjertos, fuentes de carbono, medio de soporte), la unidad experimental la constituyó 16 frascos que contenían 3 brotes cada uno, con 4 repeticiones. Al final de las 4 semanas se evaluó como primera variable el número de brotes, contando los brotes cuando la yema emergía y el brote era visible. Con la finalidad de evaluar el crecimiento y desarrollo a las 8 semanas se evaluaron las siguientes variables: altura del brote (AB), midiéndola en centímetros y contando número de hojas (NH) por brote, así mismo se contabilizaron los brotes enraizados y el número de raíces (NR) que presentaba cada brote. Los datos obtenidos se analizaron mediante el Sistema de Análisis SAS (SAS Institute, Inc, 1997). Se realizó el análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Brotación

La formación más frecuente de brotes en los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 fue 2 y 3 por explante, no encontrándose diferencias estadísticas. Además, que los tratamientos donde se adicionó 10X20F y solidificados con vermiculita, presentaron una formación de brotes estadísticamente similar ($P=0,05$) al tratamiento con agar, en los 3 portainjertos evaluados. Por otro lado se observó un porcentaje menor al 10% para la respuesta donde no se presentaron brotes, en los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 en todos los medios de cultivo con los azúcares xilosa, fructosa, 10X20F y sacarosa, solidificando el medio con agar y vermiculita (Figura 1 a y b).

Estos resultados indican que los azúcares estimularon las yemas para obtener 2 brotes, el tipo de medio y los reguladores de crecimiento es lo más importante para obtener una estimulación de las yemas y asegurar una buena formación de brotes (Kobayashi *et al.*, 2003). Por otro lado, Faria *et al.* (2004) encontraron en híbridos de especies de orquídeas, *Dendrobium nobile*, un incremento en el número de brotes con concentraciones de 20 g l⁻¹ de sacarosa, esto indica que la sacarosa es uno de los componentes del medio de cultivo que proporciona a los brotes carbono y energía. Resultados similares obtuvieron Gürel y Gülsen (1998), en almendros, *Amygdalus communis* L., con una concentración de sacarosa del 50% obtuvieron un promedio de 2,3 brotes por yema. Gollagunta *et al.* (2004) mencionan que la reducción al 50% de glucosa, fructosa y sacarosa incrementan el número de brotes por yema de *Hosta tokudama* Tratt, “Newberry Gold”.

Altura de los brotes y número de hojas

En el Cuadro, se observa que el portainjerto *C. volkameriana* presentó la 1,71-1,67 cm de AB con la combinación 10X20F y sacarosa en el medio solidificado en agar y con el sustrato inerte vermiculita. Mientras que *C. swingle* y C- 35 presentaron una menor altura 1,67 a 1,68 cm, con xilosa y fructosa en ambos medios de soporte. Con respecto al NH se encontraron 3 por brote, en todos los tratamientos, no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$).

Los datos descritos muestran que los carbohidratos estudiados no incrementaron la AB y NH; lo que indica que la presencia del azúcar es importante no así la fuente, debido a que la respuesta fue muy similar en los 3 portainjertos. Sin embargo, en otros trabajos han observado que la adición de carbohidratos como la sacarosa a 20 y 60 g l⁻¹ al medio de cultivo *in vitro*, incrementa la AB y el contenido de biomasa de brotes de *Dendrobium nobile* Lindl y en *Juniperus oxycedrus* aumenta la brotación (Gómez y Segura, 1995; Song *et al.*, 1999; Faria *et al.*, 2004). Por otro lado, Gollagunta *et al.* (2004) han mencionado que en brotes de *Hosta tokudama* Tratt. “Newberry Gold” el efecto de la sacarosa al 7% en el medio de cultivo mejoró en raíz y brotes y son los más efectivos en convertir azúcares a materia seca.

Número de brotes enraizados y número de raíces

En el Cuadro, se observa que no hubo diferencias estadísticas ($P<0,05$) entre tratamientos; sin embargo, los portainjertos, *C. volkameriana* y *C. swingle* presentaron 3 raíces absorbentes por brote con la combinación

10X20F, en el medio de cultivo con el sustrato inerte vermiculita. El portainjerto C-35 produjo 2,5 raíces por brote con los 2 sustratos y las diferentes fuentes de carbono. Estos resultados indican que la adición de xilosa, fructosa y 10X20F en el medio de cultivo estimulan la formación de raíces al igual que la sacarosa.

En la Figura 2, se muestra que el mayor porcentaje de brotes enraizados para los 3 portainjertos, fueron aquellos que provenían del medio donde se le adicionó la combinación 10X20F y sacarosa, obteniendo el 99-100% de brotes enraizados independientemente del sustrato utilizado. En comparación los brotes que provenían del medio de cultivo con xilosa y fructosa presentaron 75-89%, de enraizamiento con ambos sustratos.

Los resultados guardan relación con lo observado por Pio *et al.* (2002), quienes mencionan que el enrai-

zamiento *in vitro* de *Citrus tangerina* se obtiene cuando al medio de cultivo se le adicionó sacarosa en un 30%, es importante señalar que la sacarosa además de ser la fuente principal de carbono y energía tiene un papel osmorregulador, siendo esencial para la formación de raíces. Este hecho manifiesta la relevancia que tiene la sacarosa en el medio de cultivo *in vitro* y abre la posibilidad de usar otras fuentes de carbohidratos en el medio, sin afectar sensiblemente el desarrollo.

Al utilizar el sustrato inerte vermiculita no se observaron diferencias en ninguno de los aspectos evaluados con respecto al agar, lo que indica que este sustrato puede sustituir como medio de soporte al agar en el medio de cultivo *in vitro*, reduciendo el costo del mismo. Esto es similar a lo observado por Martínez-Hernández *et al.* (2006), que observaron que el sustrato inerte tiene un efecto similar al agar en la multiplicación de los explantes.

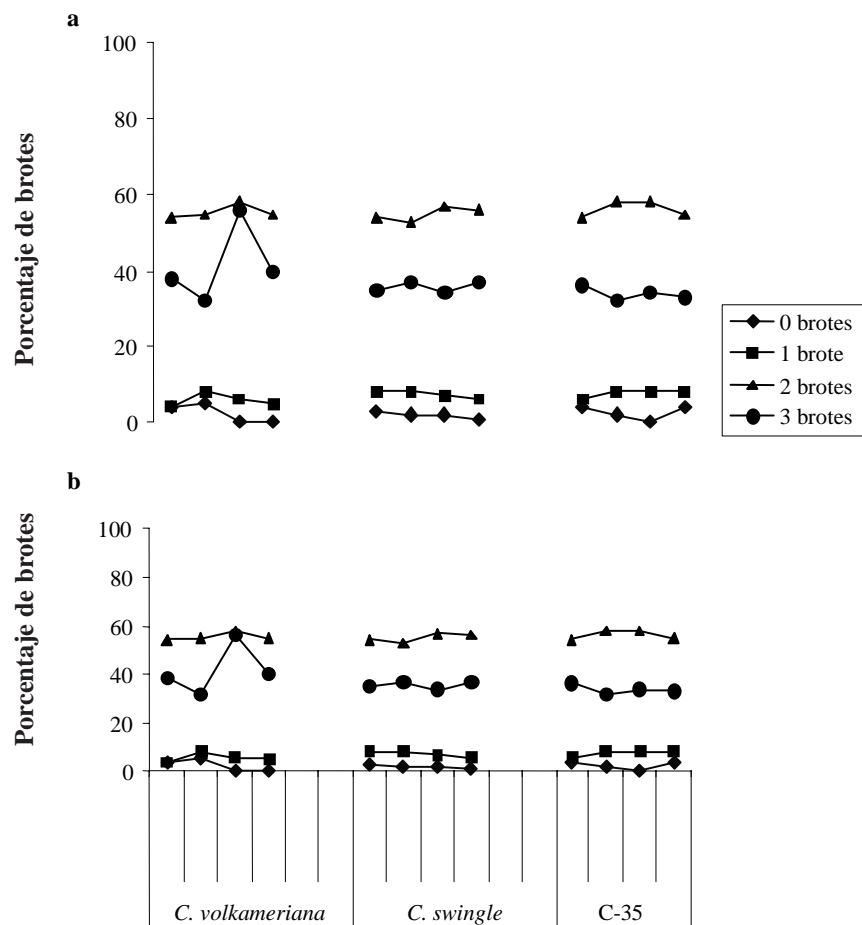


FIGURA 1. Porcentaje de brotes por explante de los patrones *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 con diferentes azúcares en agar (a) y Vermiculita (b).

CUADRO. Altura de los brotes, número de hojas por brote y número de raíces por brote de los portainjertos de *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, con la presencia de diferentes azúcares.

Portainjertos	Sustrato	Azúcar	Altura de los brotes* (cm)	N° de hojas por brote*	N° de raíces por brote*
<i>C. volkameriana</i>	Agar	10X20F	1,71	3,01	2,00
		Sacarosa	1,71	3,04	2,61
		Xilosa	1,67	3,02	2,51
		Fructosa	1,67	3,04	2,51
	Vermiculita	10X20F	1,71	3,00	3,01
		Sacarosa	1,71	3,00	2,51
		Xilosa	1,67	3,00	2,48
		Fructosa	1,68	3,03	2,44
<i>C. swingle</i>	Agar	10X20F	1,69	3,00	2,55
		Sacarosa	1,68	3,00	2,51
		Xilosa	1,67	3,04	2,35
		Fructosa	1,68	3,02	2,48
	Vermiculita	10X20F	1,71	3,00	3,02
		Sacarosa	1,68	3,00	2,48
		Xilosa	1,68	3,02	2,31
		Fructosa	1,68	3,00	2,44
C- 35	Agar	10X20F	1,68	3,09	2,47
		Sacarosa	1,68	3,03	2,50
		Xilosa	1,67	3,00	2,48
		Fructosa	1,67	3,06	2,51
	Vermiculita	10X20F	1,68	3,03	2,45
		Sacarosa	1,68	3,02	2,48
		Xilosa	1,67	3,00	2,44
		Fructosa	1,67	3,04	2,50
	Vermiculita	10X20F	1,71	3,00	3,01
		Sacarosa	1,71	3,00	2,51
		Xilosa	1,67	3,00	2,48
		Fructosa	1,68	3,03	2,44
<i>C. swingle</i>	Agar	10X20F	1,69	3,00	2,55
		Sacarosa	1,68	3,00	2,51
		Xilosa	1,67	3,04	2,35
		Fructosa	1,68	3,02	2,48
	Vermiculita	10X20F	1,71	3,00	3,02
		Sacarosa	1,68	3,00	2,48
		Xilosa	1,68	3,02	2,31
		Fructosa	1,68	3,00	2,44

.../... continúa

../... continuación CUADRO.

Portainjertos	Sustrato	Azúcar	Altura de los brotes* (cm)	N° de hojas por brote*	N° de raíces por brote*
C- 35	Agar	10X20F	1,68	3,09	2,47
		Sacarosa	1,68	3,03	2,50
		Xilosa	1,67	3,00	2,48
		Fructosa	1,67	3,06	2,51
	Vermiculita	10X20F	1,68	3,03	2,45
		Sacarosa	1,68	3,02	2,48
		Xilosa	1,67	3,00	2,44
		Fructosa	1,67	3,04	2,50

* Sin diferencia estadística entre columnas ($P < 0,05$).

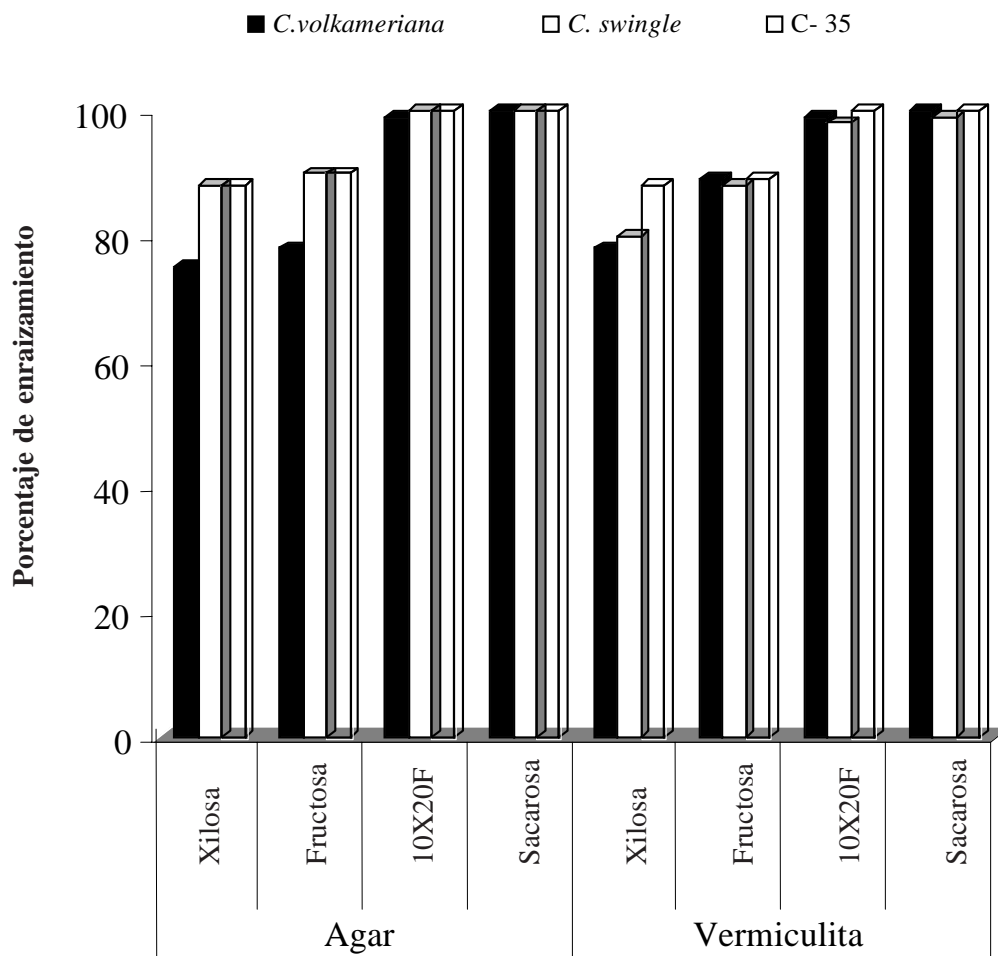


FIGURA 2. Porcentaje de brotes enraizados de *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, con diferentes azúcares.

CONCLUSIONES

- Los resultados de este estudio permitieron comparar diferentes fuentes de carbohidratos, observándose que no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos. El porcentaje de enraizamiento con sacarosa y la combinación 10X20F fue del 99-100%, para los materiales evaluados, mientras que xilosa y fructosa sólo alcanzó el 75-89%. Comparando el agar con el sustrato inerte vermiculita el comportamiento de los brotes fue muy similar, por lo que el sustrato vermiculita puede ser utilizado en sustitución del agar.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz y a la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus Xalapa de la Universidad Veracruzana, por los apoyos para la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Cárdenas L., Ma. A y A. Villegas M. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.* 25(2):213-217.
- Cervera, F., M. Fagoaga, C. Duran-Vila and N. L. Peña. 2004. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta Horticulturae* 632:221-234.
- Chen, Y., S. Lin, P. Duguid, E. Dribnenki and E. Kenaschuck. 2003. Effect of sucrose concentration on elongation of shoots from flax anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 68:49-55.
- Chu, E. P. and R. C. L. Figueiredo-Ribeiro. 2002. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of dioscorea species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 70:241-249.
- FAO. 2005. Base de datos de FAOSTAT. Food and agriculture organization. <http://www.apps.fao.org>. Food and agriculture organization. Consultado el 15 de abril de 2006.
- Faria R., T., F. N. Rodriguez, L. V. R. Oliveira and C. Muller. 2004. *In vitro* Dendrobium nobile plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, Brasilia. 22(4):780-783.
- García, J., L. J. Troncoso, R. Sarmiento and A. Troncoso. 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 69:95-109.
- Gollagunta, V. J., W. Adelberg, R. Rieck and N. Rajapakse. 2004. Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 77:125-131.
- Gómez, M. P. and J. Segura. 1995. Axillary shoot proliferation in cultures of explants from mature Juniperus oxycedrus trees. *Tree Physiology* 15(9):625-628.
- Gürel, S. e Y. Gülsen. 1998. The effects of different sucrose, agar and pH level on *in vitro* shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Tr. Journal of Botany* 22:363-373.
- Gutiérrez E., M. A. 1996. Memorias IV Simposium Internacional sobre Sistemas de Producción de Cítricos. Universidad Autónoma Chapingo, Vol.1. 28-3 de Octubre. Tuxpan, Ver., México. 1:95-98.
- Kataoka, I. 1994. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *in vitro*. *Japan Journal Tropical Agronomy* 38(3):251-257.
- Kobayashi, A. K., J. C. Besspalhok, L. F. P. Pereira and L. G. E. Viera. 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 74(1):99-102.
- Martínez-Hernández, M. D. J., L. A. Alonso, F. Osorio-Acosta, L. F. Gallardo, M. H. López y R. M. Mata. 2006. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia.* 31(8):616-619.
- Medina-Urrutia, V. M. y J. Valdez-Verduzco. 1990. Crecimiento y producción de limón Bears (*Citrus latifolia* Tanaka) sobre ocho portainjertos en dos condiciones de suelo. **In:** XIII Congreso Nacional de Fitogenética. 167 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum.* 15:473-497.

- Murcia, R. N., A. J. Osorio, A. Caicedo, L. Calvert y F. Morales. 2002. Distribución y caracterización serológicas de aislamiento del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 26:21-26.
- Orozco-Santos, M. 1996. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo, México. 150 p.
- Padrón J., E. 2000. Precauciones y uso de patrones cítricos tolerantes a tristeza. *Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C.P.* pp.36-43.
- Pio, R., J. D. Ramos, L. A. S. PIO, V. Mendonca, A. B. Silva and M. Pasqual. 2002. *In vitro* rooting of sprouts of Tangerina sunki x Trifoliata english 63-256 citrus rootstocks through the use of sucrose and indolebutyric acid. *Ciência e Agrotecnologia*. 26(1)66-70.
- Ruzéicã, D., M. Saricã, R. Cerovicã and L. Cãulãficã. 2000. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 63:9-14.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA. 2007. Sembrando soluciones. Secretaria de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/cgs/sembrando>. Consultado el 11 de Marzo de 2007.
- SAS Institute Inc. 1997. SAS/STAT User´guide, version 6.12. University of Minnesota.
- Simoes M. O. M., E. A. M. Da Silva, L. Teixeira e P. R. Cecom. 1990. Obtencao de brotaoes adventicias de *Citrus sinensis* (L). Osbek de regioes isoladas de internódios em diferentes estádios de desenvolvimento. *Resvista Ceres* 37:337-344.
- Singh I., P. 2002. Micropropagation *in citrus*. *Agricultural Reviews* 23(1):1-13.
- Slesak, H., A. Skoczowski and L. Przywara. 2004. Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 79:45-5.
- Song M., K. R., G. L. Silva, R. T. Faria e L. S. A. Takahashi. 1999. Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium novile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. **In:** Congresso Brasileiro de Floricultura e plantas ornamentais. Jaboticabal, Anais. SP, Brasil. p.110.
- Zimmerman, R. H. 1995. Enviromental effects and their control in plant tissue culture Overview. *Acta Horticulturae* 393:11-13.