

# Efecto del ácido indolacético sobre el desarrollo *in vitro* de los tejidos del fruto de naranjo dulce var. Salustiana

## Effect of the indolacetic acid on the *in vitro* development of the fruit tissues of the sweet orange var. Salustiana

Alexander Rebolledo R.,<sup>1</sup> Amparo García-Luis,<sup>2</sup> José L. Guardiola B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ing. Agr. Ph.D. Corpoica - Palmira. [arebolledor@corpoica.org.co](mailto:arebolledor@corpoica.org.co) <sup>2</sup>Bióloga Ph.D Universidad Politécnica de Valencia (España). <sup>3</sup>Ing. Agr. Ph.D. Universidad Politécnica de Valencia (España)

REC.: 19-09-07 ACEPT.:15-11-07

### RESUMEN

Se caracterizó el efecto de cuatro concentraciones ( $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M) de ácido indolacético (AIA) y del tipo de explanto sobre el desarrollo *in vitro* de los tejidos del fruto del naranjo dulce *Citrus sinensis* (L) Osbeck, de la variedad salustiana. La máxima respuesta se obtuvo con explantos de frutos de 6 días con las concentraciones más elevadas ( $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M). En este momento del desarrollo las células de los tejidos del fruto se encontraban en división. La capacidad de respuesta de los tejidos se redujo después de 31 días de desarrollo, cuando se inició la diferenciación celular del mesocarpio interno. El aumento en el tamaño de vesícula en explantos de frutos de 6 días de edad sugiere que el cultivar salustiana responde a la aplicación de auxinas durante el estado de desarrollo temprano del fruto, actuando directamente sobre este tejido.

**Palabras claves:** *Citrus sinensis* var. Salustiana; cultivo *in vitro*; ácido indolacético; explantos de fruto.

### ABSTRACT

The effect of 4 concentrations of the indolacetic acid as well as the explant type on the *in vitro* development of the sweet orange fruit tissue [*Citrus sinensis* (L) Osbeck] Salustiana variety was characterized. A maximum response in explants of 6-d-old fruitlets was obtained with the higher concentrations ( $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  M). At this development stage, fruit tissue cells were dividing. A decrease in the fruit response capacity after day 31 was verified. At this moment, cellular differentiation in the internal mesocarp was starting. The increase in size of the vesicle explants of 6-d-old fruitlets suggests a response of the Salustiana cultivar to auxin applications during the early stage of fruit development. This hormone can operate directly on this tissue.

**Key words:** *Citrus sinensis* var. Salustiana; *in vitro* culture; indolacetic acid; fruit explants.

### INTRODUCCIÓN

El naranjo dulce de la variedad Salustiana [*Citrus sinensis* (L) Osbeck] es alternante y produce frutos pequeños en años de elevada floración (años on). Dada la importancia del tamaño del fruto como un parámetro de calidad comercial en cítricos, se han obtenido avances significativos en la utilización de reguladores de crecimiento para incrementar el tamaño del fruto. La respuesta observada en campo se ha caracterizado *in vitro* en mandarina satsuma, aportando evidencias del cambio marcado en la sensibilidad de los tejidos con el

avance en el estado de desarrollo del fruto (Guardiola *et al.* 1993).

Los primeros estudios sobre el comportamiento *in vitro* de explantos de albedo y vesículas de zumo de *Citrus limon* fueron llevados a cabo por Murashige y Tucker (1969), y obtuvieron crecimiento de callo con la adición de 2,4-D en concentraciones de  $10^{-8}$  hasta  $10^{-6}$  M. Posteriormente Kordan (1977) obtuvo formación de callo en vesículas de zumo independientemente de la composición del medio. Gulser *et al.* (1981) y Altmar *et al.* (1982), trabajando con explantos de endocarpio de *Citrus limon* var. Eureka hicieron los primeros estudios sobre

el desarrollo organizado de vesículas sin formación de callo y ordenaron los reguladores de crecimiento de la siguiente manera: GA > BA > IAA > medio basal.

La respuesta *in vitro* de células, tejidos y órganos puede variar de acuerdo con las condiciones de cultivo, el tipo, tamaño y edad del explanto y el genotipo de la planta, y está regulada por la interacción y balance entre reguladores de crecimiento suministrados al medio y sustancias de crecimiento producidas endógenamente por el explanto (George, 1993).

La formación de callo es característica de tejidos que se dividen activamente, y en explantos de endocarpo se puede presentar cuando la actividad meristemática de las vesículas se mantiene; una vez cesa, se obtiene un desarrollo organizado de vesículas (Harada *et al.* 2001). Explantos de endocarpo de *C. unshiu* de frutos de 5 a 50 días de edad forman callo con la adición de BA, GA y 2,4,5-T. Con explantos de frutos de 60 días se obtiene un desarrollo organizado de vesículas con concentraciones de  $10^7$  a  $10^{-8}$  M de 2,4,5-T (Guardiola *et al.* 1993). En *Citrus limon* se ha establecido una relación inversa entre el tamaño del explanto utilizado y la formación de callo (Tisserat, *et al.* 1989).

Por las consideraciones anteriores, la investigación caracterizó la respuesta *in vitro* de los tejidos del fruto con la adición de auxinas al medio, determinando la influencia de la edad y tipo de explanto y del nivel de concentración de la auxina aplicada

### MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la localidad de Museros, Valencia (España), en árboles de 20 años del naranjo dulce de la variedad Salustiana (*C. sinensis*) injertado sobre patrón citrange Troyer [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. Se tomaron muestras cada cinco días de frutos de inflorescencias campaneras de árboles con nivel de floración alto, desde 6 hasta 76 días después de anthesis (DDA).

Durante los primeros 31 DDA se utilizó como explanto la sección completa del diámetro ecuatorial

de frutos de tamaños grandes, medianos y pequeños. Después de 31 días se utilizaron como explanto los tejidos separados: mesocarpo y endocarpo, y se emplearon frutos de un mismo diámetro (Tabla 1). Se hicieron cortes transversales por la región ecuatorial de frutos lavados y esterilizados, aproximadamente de 3 mm de grosor. Se utilizó un diseño completamente al azar, en donde la unidad experimental estuvo constituida por cada recipiente de cultivo.

Los explantos se cultivaron en medio basal de Murashige y Skoog (1962), con 100 mg/l de *m-inositol*, 1 mg/ml de Tiamina – HCl y 30 g de sacarosa, suplementado con 10% de zumo de naranja (v/v) (Erner *et al.*, 1975). Para la solidificación del medio se añadieron 8 g de agar previo al autoclavado. El pH del medio se ajustó a 5.7 con 0.1 N KOH y se autoclavó por 30 minutos a 115 °C (Guardiola *et al.*, 1993).

Las hormonas se esterilizaron por filtración y se adicionaron al medio de cultivo, tras alcanzar una temperatura que no las inactivara. El medio se distribuyó homogéneamente en los recipientes de cultivo (50 ml) y una vez sembrados los explantos, se incubaron durante 35 días en oscuridad a 27±1 °C.

Para el estudio histológico se seleccionaron explantos tras 7 y 35 días de incubación y se siguió la metodología de Johansen (1940). El tejido fijado se sumergió en alcohol al 70% durante 5 minutos y se deshidrató en soluciones de concentración creciente de alcohol butílico. Se depositó en una mezcla líquida 1:1 de butanol y parafina (Parafin wax de Fluka Chemika®) y se mantuvo en estufa a 60 °C durante 24 horas; transcurrido este tiempo se sustituyó por parafina pura, manteniéndolo durante 24 horas.

Posteriormente se colocó una capa de parafina líquida en moldes de papel parafinado, se tomó el material y se introdujo en el molde. Seguidamente, el molde se introdujo en agua helada. Una vez sólidos los bloques de parafina se montaron sobre tacos de madera, se ajustaron sobre un micrótopo de deslizamiento R. Jung y se realizaron cortes de 12 µm de grosor. En la

Tabla 1. Diseño de tratamientos

Tipo de explanto		Concentración de AIA (mg/l)					Explantos / Unidad Experimental	Número de repeticiones
Región ecuatorial del fruto	Frutos grandes	Testigo	17	1.7	0.17	0.017	5	3
	Frutos medianos	Sin AIA	( $10^{-5}$ M)	( $10^{-6}$ M)	( $10^{-7}$ M)	( $10^{-8}$ M)	5	3
	Frutos pequeños						5	2
Tejidos de fruto separados	Mesocarpo	Testigo	17	1.7	0.17	0.017	4	8
	Endocarpo	Sin AIA	( $10^{-5}$ M)	( $10^{-6}$ M)	( $10^{-7}$ M)	( $10^{-8}$ M)		

tinción se utilizó safranina acuosa y verde luz como colorantes.

Para comparar las medias se realizó un análisis de varianza y se utilizó como software el SPSS, en el que se incluye la prueba de DMS y los subconjuntos homogéneos según Duncan.

## RESULTADOS

### Características anatómicas de los tejidos del fruto

Los frutos de 6 días presentaron epidermis con células rectangulares y glándulas de aceite en distintos estados de desarrollo y mesocarpo con células parenquimáticas pequeñas en división. En la zona adaxial de los lóculos se formaron primordios de vesículas a partir de divisiones anticlinales y periclinales de la primera y segunda capa de células epidérmicas y subepidérmicas del endocarpo. El cilindro central está formado por células parenquimáticas en donde se encuentran los haces vasculares marginales. Los haces vasculares dorsales se encuentran junto a la superficie adaxial de los lóculos y al igual que los septales y marginales se presentaron poco desarrollados (Figura 1A).

Los cambios más notorios a partir del día 31 se presentaron en mesocarpo y endocarpo. En el mesocarpo se diferenciaron dos zonas, el externo con 4 a 6 filas de células pequeñas que aún se encuentran en división y el interno formado por células grandes, vacuoladas, poligonales y con amplios espacios intercelulares. En el endocarpo las vesículas se observaron más desarrolladas, producto de la actividad meristemática y formaron el filamento (Figura 1B), y alcanzaron  $0.65 \pm 0.01$  mm. En frutos de 46 días en el mesocarpo externo se presentaron pocas filas de células. En el endocarpo la actividad meristemática de la vesícula se detuvo y dio paso al ensanchamiento y a la vacuolización de algunas células (Figura 1C).

### Patrón de desarrollo *in vitro* de los tejidos del fruto

Los explantos de frutos de 6 a 46 días cultivados *in vitro* formaron callo en el tratamiento testigo sin AIA y en los tratados con esta hormona. Con la adición de AIA se observaron diferencias en la zona de formación del callo (apical o basal, Figura 2). Además se presentaron diferencias en el tipo de células que conforman el callo entre explantos tratados con AIA o sin ella.

Los explantos incubados sin AIA, tras 7 días de incubación, formaron callo en la superficie del corte que no estaba en contacto con el medio y en la superficie lateral recubierta por el exocarpo. El callo en

la superficie apical se originó a partir del mesocarpo y del cilindro central; las células fueron grandes y vacuoladas (Figura 2). La zona basal del explanto en contacto con el medio no formó callo. Con 35 días de incubación los explantos mantuvieron el mismo patrón de desarrollo.

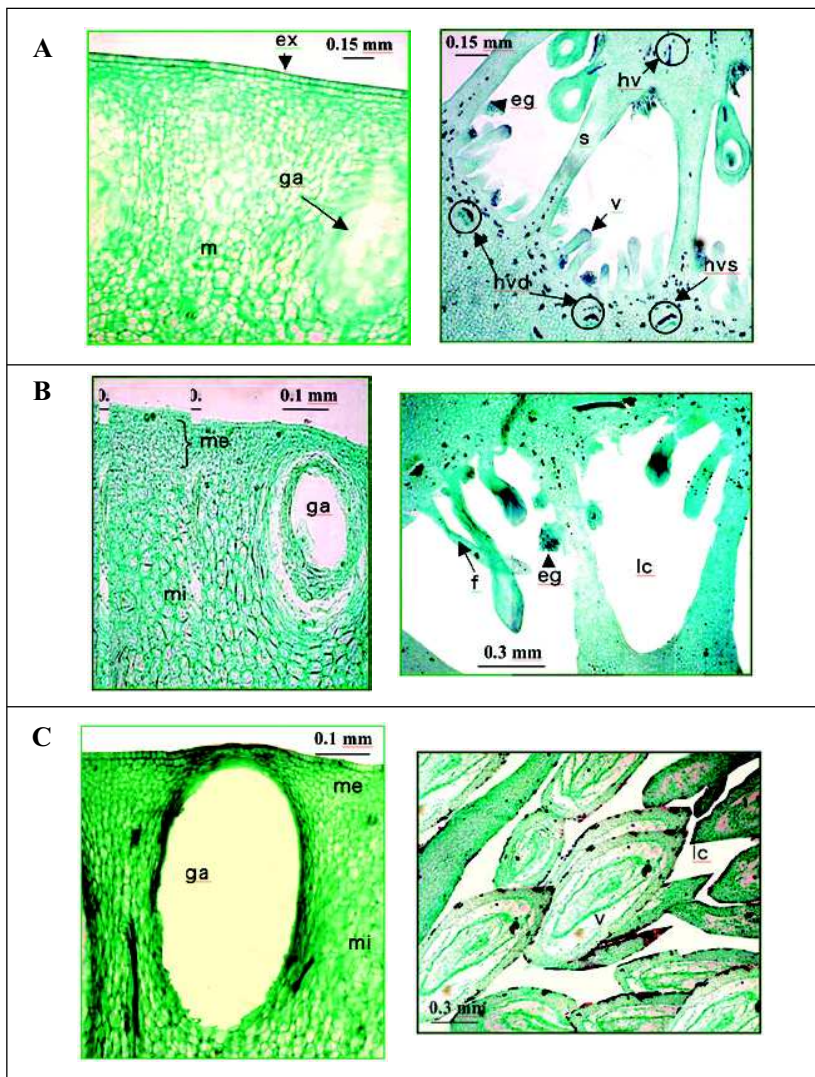
La presencia de AIA en el medio de incubación modificó el patrón de desarrollo. Con una concentración de AIA  $10^{-6}$  M se formó callo en la superficie apical, mientras que con una concentración más alta ( $10^{-5}$  M) se formó callo tanto en la superficie apical como en la basal del explanto (Figura 3). En todos los casos el callo presentó células pequeñas (Figura 3A). En presencia de AIA ( $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M) en el mesocarpo externo se formó una región con actividad cambial (Figura 3B). Tras 35 días de incubación esta región originó entre 8 a 10 células en fila.

Las vesículas mantuvieron un desarrollo organizado sin formación de callo, tanto en los inóculos cultivados en presencia de AIA como en los incubados sin esta hormona. Se observaron diferencias en tamaño entre explantos incubados con AIA y en ausencia de la misma. No se presentó crecimiento en las vesículas en explantos del tratamiento testigo. Tras 7 días de incubación presentaron igual tamaño que el día de la siembra ( $0.15 \pm 0.004$  mm). En los tratamientos de AIA  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M se presentó mayor tamaño de vesícula, que alcanzó casi 3 veces ( $0.43 \pm 0.01$  mm.) y 2 veces ( $0.30 \pm 0.01$  mm.) el tamaño en explantos sin AIA (Figura 4).

Los explantos de vesículas de frutos de 46 días manifestaron un desarrollo organizado con células en expansión, sin formación de callo, tanto en el tratamiento testigo como en la concentración de AIA  $10^{-6}$  M. Del mismo modo en la superficie lateral y basal de los inóculos se observaron entre 2 y 3 filas de células modificadas con paredes engrosadas (Figuras 5). Los explantos de mesocarpo desarrollaron callo en la superficie apical del explanto, con el mismo tipo de células características de los tratamientos de AIA  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M y del tratamiento testigo, en las fechas anteriores

### Aumento en peso de los explantos

En explantos de frutos de 6 días el aumento en peso de los inóculos se debió al crecimiento del mesocarpo y al callo que se formó a partir de este tejido y del cilindro central. Los inóculos presentaron un peso inicial de  $292 \pm 20$  mg en frutos grandes,  $150 \pm 13$  mg en frutos medianos y  $59 \pm 4$  mg en frutos pequeños. El aumento en peso de estos inóculos y la respuesta al AIA estuvo



**Figura 1.** Características anatómicas de los tejidos de frutos de 5 (A), 31 (B) y 45 (C) días después de antesis: ex: exocarpo ga: glándulas de aceite, m: mesocarpo, me: mesocarpo externo, mi: mesocarpo interno, hvd: haz vascular dorsal, hvs: haz vascular septal, hv: haz vascular marginal, eg: emergencias glandulares, s: septos, v: vesículas.

**Figura 2.** Tratamiento control con formación de callo (c) en la zona apical (za) del explanto, con células grandes y vacuoladas.

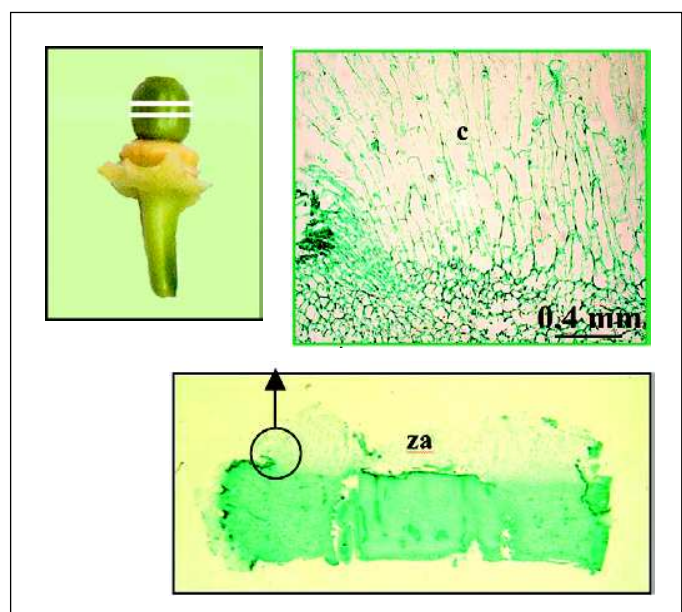


Figura 3. Tratamiento de AIA  $10^{-5}$  M con formación de callo (c) en la zona apical (za) y basal (zb) del explanto. Callo apical con células pequeñas en división (A). Formación de zona con actividad cambial y formación de callo basal (zc) (B).

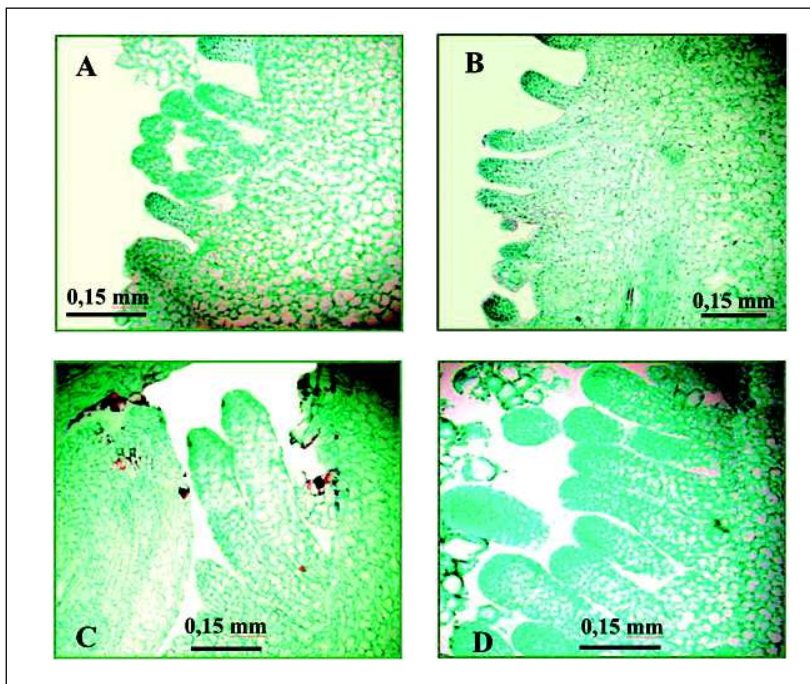
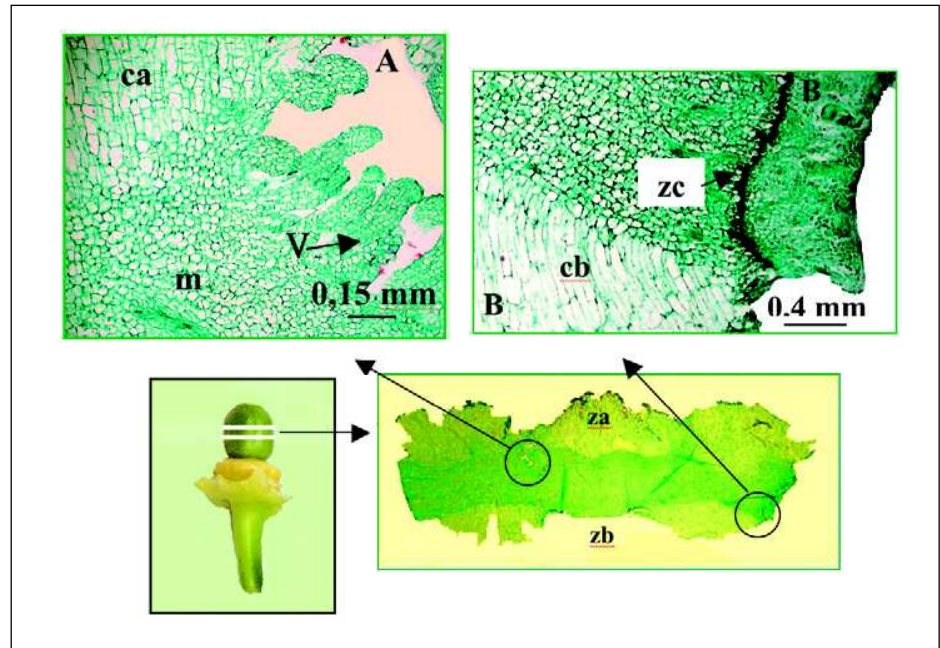
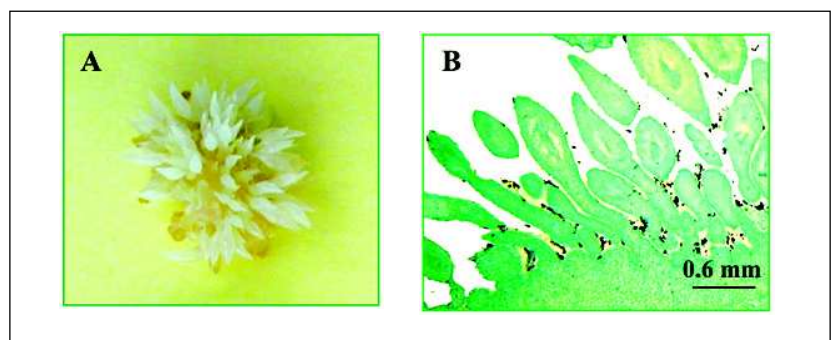


Figura 4. Tamaño de vesículas en explantos de frutos de diámetro medio, de 6 días de edad, tras 7 días de incubación: (A) Aspecto de los explantos en el momento de la siembra. (B) tratamiento testigo (sin AIA). (C) concentración de AIA  $10^{-5}$  M. (D) concentración de AIA  $10^{-6}$  M

Figura 5. Explantos de frutos de más de 45 días, con 35 días de incubación (A). Sección longitudinal de endocarpo con desarrollo organizado de vesículas (B).



afectada por el tamaño del fruto del que se tomaron (Figura 6A).

Los inóculos de los frutos grandes presentaron el máximo crecimiento con una concentración de AIA menor ( $10^6$  M) y los de frutos pequeños con  $10^5$  M. A esta concentración se observó reducción en el crecimiento de los inóculos de frutos grandes (Figura 6A).

Con explantos de frutos de 31 días en que presentaron un peso inicial de  $823 \pm 50$  mg en frutos grandes,  $509 \pm 50$  mg en frutos medianos y  $300 \pm 20$  mg en frutos pequeños, el aumento en peso no fue afectado por las concentraciones de AIA ensayadas (Figura 6B).

El día 46 los inóculos de mesocarpo presentaron máxima respuesta con una concentración menor ( $10^{-6}$  M) que el día 61, en que sólo hubo respuesta con la concentración más alta de AIA ( $10^{-5}$  M). El día 76 el

aumento en peso de los inóculos de mesocarpo no fue afectado por los niveles de AIA ensayados. En este momento los inóculos de exocarpo aun manifestaron respuesta positiva a las concentraciones más elevadas de AIA ( $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M; Figura 6).

Los inóculos de vesículas presentaron un peso inicial de 80 mg el día 46. Tras 35 días de incubación, el aumento en peso solo fue afectado por la concentración de AIA  $10^{-6}$  M. Con explantos de vesículas de frutos de 61 y 76 días, en que presentaron un peso inicial de 140 mg y 310 mg, respectivamente, el aumento en peso tras 35 días de incubación no fue afectado por las concentraciones de AIA ensayadas (Figura 7).

### DISCUSIÓN

La respuesta *in vitro* de los tejidos del fruto al AIA estuvo relacionada con el estado de desarrollo del fruto y

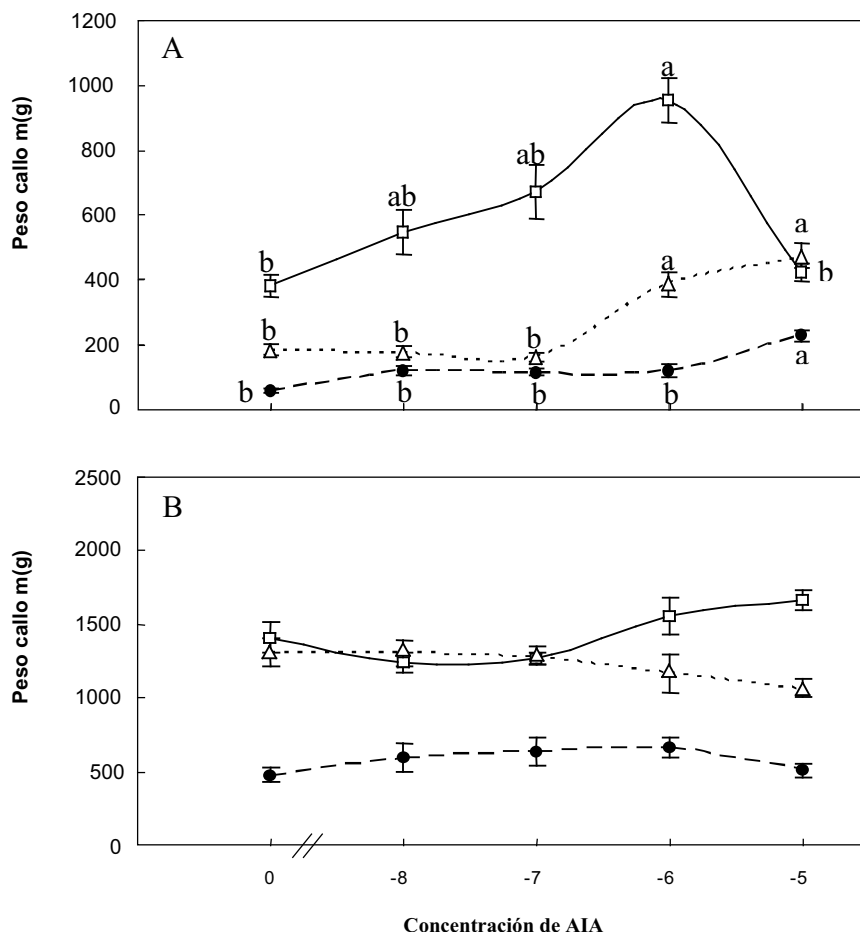


Figura 6. Curvas de crecimiento de explantos de frutos grandes (□), medianos (△) y pequeños (●) para las variables peso de callo en frutos de 16 (A) y 31 (B) días después de antesis. Para cada tipo de explanto, valores en cada parámetro con letras distintas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ), según el test de Duncan, realizado para todas las concentraciones ensayadas.

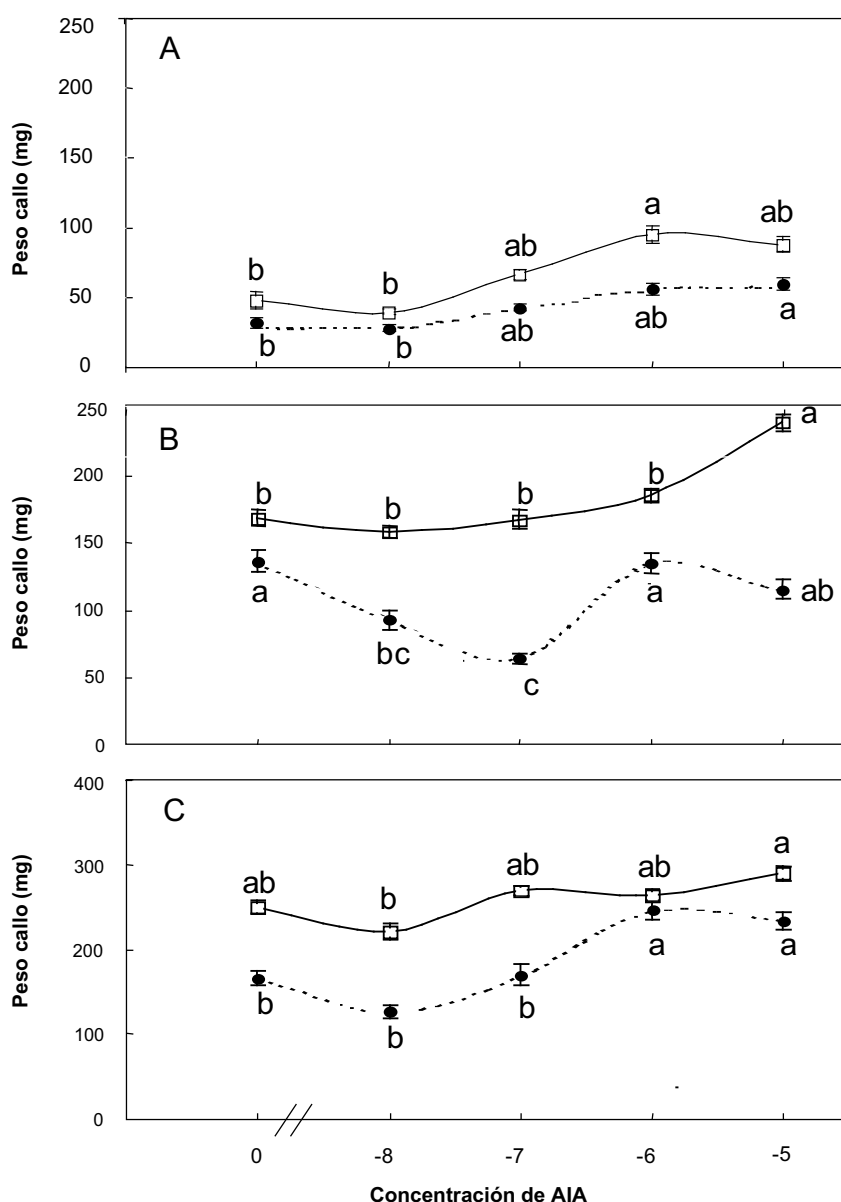


Figura 7. Peso de callo de explantos de mesocarpo (□) y exocarpo (●) en frutos de 46 (A), 61 (B) y 76 (C) días después de antesis. Para cada tipo de explanto, valores en cada parámetro con letras distintas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ), según el test de Duncan, realizado para todas las concentraciones ensayadas.

con la concentración presente en el medio de cultivo. Al considerar el aumento en peso del inóculo, la respuesta al AIA en frutos de 16 días dependió del tamaño de fruto del cual se obtuvo el inóculo; los inóculos de frutos grandes (diámetro  $13.43 \pm 0.11$ ) no fueron afectados por las concentraciones de AIA ensayadas, mientras que en frutos medianos (diámetro  $11.01 \pm 0.13$ ) y pequeños (diámetro  $7.85 \pm 0.08$ ) se obtuvo una mayor respuesta

con las concentraciones de AIA más elevadas ( $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M). Con frutos de 31 días no se obtuvo respuesta a las concentraciones de AIA evaluadas.

El comportamiento en la variedad Salustiana coincidió con los resultados obtenidos por Guardiola *et al.* (1993) y Harada *et al.* (2001). Con pequeñas piezas de endocarpo de mandarina satsuma de 5 a 50 días obtuvieron crecimiento vigoroso de callo en explantos

de frutos de 5 días que disminuyó con el aumento en la edad del fruto (hasta 50 días).

Las características encontradas en el tipo de células que conforman el callo en los inóculos tratados con AIA y sin tratar se convierten en una característica clave del patrón de desarrollo *in vitro* de los tejidos del fruto. Mientras que en inóculos del tratamiento control las células del callo se caracterizaron como grandes, elongadas y vacuoladas, con la adición de AIA al medio, el callo estuvo formado por células pequeñas.

Este comportamiento coincide con la descripción hecha por Krikorian (1995), quien plantea que un indicador de la respuesta *in vitro* de explantos a la adición de auxinas es que en las zonas de corte las auxinas promueven mayor división celular y mejoran la iniciación y mantenimiento del callo. Del mismo modo, Khan *et al.* (1996), con explantos de endocarpo de *C. limon*, incrementaron el crecimiento de callo por aumento en la tasa de división celular, después de incorporar AIA en concentración de  $10^{-5}$  M.

Hasta el día 31 en que se utilizó como inóculo una sección transversal de la región ecuatorial del fruto, con la adición de concentraciones de AIA  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, se formó en el mesocarpo externo una zona con actividad cambial. Tadeo, *et al.* (1988) describen las características del mesocarpo externo con células poco vacuoladas, con paredes delgadas y abundante citoplasma, que evidencian a este estrato celular como un meristemo activo que origina células hacia el mesocarpo interno. Los resultados obtenidos en el estudio sugieren una posible contribución de las auxinas exógenas sobre la mayor actividad metabólica de este tejido y, en efecto, un aporte al incremento del tamaño inicial del fruto.

También al utilizar como inóculo una sección transversal de la región ecuatorial del fruto se presentó desarrollo organizado de vesículas dentro de la cavidad locular. Tisserat *et al.* (1989) establecieron relación inversa entre tamaño de inóculo y porcentaje de callo formado en frutos de *Citrus limon*, y determinaron que al utilizar como explanto la mitad del fruto se obtiene un desarrollo organizado de vesículas, y que piezas pequeñas de endocarpo producen callo. Estos autores plantean que la capacidad potencial de las vesículas para producir callo se ve fuertemente estimulada cuando se producen heridas en el tejido al momento de obtener el inóculo.

Al utilizar como inóculo pequeñas piezas de mesocarpo disminuyó el aumento en peso con el avance del estado de desarrollo del fruto. El día 46 los inóculos

de mesocarpo presentaron máxima respuesta con una concentración menor ( $10^{-6}$  M) que el día 61 en que sólo hubo respuesta con la concentración más alta de AIA ( $10^{-5}$  M). El día 76 el aumento en peso de los inóculos de mesocarpo no fue afectado por los niveles de AIA ensayados. Al describir las características anatómicas de frutos de 46 días se verifica la presencia de mesocarpo externo en división.

Con el avance del estado de desarrollo el mesocarpo estuvo formado por células diferenciadas, vacuoladas, poligonales y con amplios espacios intercelulares. El aumento en peso de inóculos de 46 días posiblemente se presentó por efecto promotor del AIA sobre el mesocarpo externo. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios realizados por Amo – Marco *et al.* (1994) con inóculos de mesocarpo de *C. sinensis* que lograron máximo crecimiento de callo en frutos de 33.5 a 43.4 mm de diámetro, que se encontraban entre los estados I y II de crecimiento.

A partir del día 46 se inocularon por separado las vesículas. En este momento se comprueba el inicio de la expansión celular por la vacuolización de las células centrales de las vesículas. Los inóculos cultivados en esta fase de crecimiento presentaron desarrollo organizado en todos los tratamientos y coincidieron con los trabajos realizados por Guardiola *et al.* (1993) y Harada *et al.* (2001), quienes relacionan el desarrollo organizado de vesículas con el comienzo del segundo estado de desarrollo del fruto. La presencia de auxinas en el medio no incrementó el tamaño de las vesículas

## CONCLUSIONES

Con el estudio *in vitro* de los tejidos del fruto se verificó una pérdida en la capacidad de respuesta al ácido indolacético con el avance en el estado de desarrollo del fruto. El AIA tuvo efecto evidente sobre el patrón de desarrollo *in vitro* de explantos de frutos de 6 a 76 días después de antesis, manifestado en el tipo de células que conforman el callo, en el tamaño de vesícula de explantos de frutos de 6 días y en su efecto sobre la zona cambial formada en el mesocarpo externo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Conselleria de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Valenciana (España), por las subvenciones concedidas al profesor Dr. D. J. L. Guardiola Bárcena, que han permitido la financiación del proyecto GV-CAPA00-11 que acogió como doctorante a A. Rebolledo R.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Altman, A.; Gulsen, Y.; Goren R. 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants *in vitro*. *Plant Physiol* 69: 1-6.
2. Amo – Marco J. B.; Picazo I. 1994. *In vitro* culture of albedo tissue from fruits of *Citrus sinensis* cv. Washington Navel: Effect of fruit age and orange juice. *J. Hort. Sci.* 69: 929 – 935.
3. Erner, Y.; Reuveni, O.; Goldschmidt, E. E. 1975. Partial purification of a growth factor from orange juice which affects citrus tissue culture and its replacement by citric acid. *Plant Physiol.* 56: 279-282.
4. George, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. Reading, Exegenetics Ltd.
5. Guardiola, J. L.; Barres, M. T.; Albert, C.; García-Luis, A. 1993. Effects of exogenous growth regulators on fruit development in *Citrus unshiu*. *Ann. Bot.* 71: 169-176.
6. Gulsen, Y.; Altman, A.; Goren, R. 1981. Growth and development of citrus pistils and fruit explants *in vitro*. *Physiol Plant* 53: 295-300.
7. Harada, H.; Hiroo, M.; Toshihiko, T. 2001. Effects of explant age, growth regulators and carbohydrates on sugar accumulation in citrus juice vesicles cultured *in vitro*. *Sci. Hort.* 90: 109-119.
8. Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, N.Y. McGraw-Hill.
9. Khan, A. 1996. Role of auxin, kinetin, gibberellic acid and l-methionine on cell division and tracheary element differentiation in *C. limon* juice vesicle culture. *Phytomorphol.* 46 (4): 349-356.
10. Krikorian, A D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: (ed.) *Plant hormones*: Kluwer Academic Publishers. 774-796.
11. Kordan, H. A. 1977. Sucrose activation of mitosis in lemon fruit explants (*Citrus limon* L.). *Experimentia* 33: 924-925.
12. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture *Physiol Plant* 15: 473-497.
13. Murashige, T.; Tucker, D. P. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proceedings first international citrus symposium* 3: 1155-1161.
14. Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E. 1988. Ultrastructural changes in the developing ovarios of citrus *Internacional Citrus Congress* 1: 417-429.
15. Tisserat, B.; Jones, D.; Galleta-P. D. 1989. Growth responses from whole fruit and fruit halves of lemon cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.* 76 (2): 238 – 246.