

**Propagación *in vitro* de lima ácida
(*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle)
-variedad Tahití- a partir de segmentos
nodales**

Marco Vinicio Vidal Rivera

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Propagación *in vitro* de lima ácida
(*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle)
-variedad Tahití- a partir de segmentos
nodales**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Marco Vinicio Vidal Rivera

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2014

**Propagación *in vitro* de lima ácida
(*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle)
-variedad Tahití- a partir de segmentos nodales**

Presentado por:

Marco Vinicio Vidal Rivera

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M. Sc.
Asesora Principal

Renán Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Mauricio Huete Ramírez, Ing. Agr.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Cinthyia Martínez, M.B.A.
Asesora

**Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle)
-variedad Tahití- a partir de segmentos nodales**

Marco Vinicio Vidal Rivera

Resumen. La lima ácida pertenece a la familia Rutaceae y es producida en climas tropicales y subtropicales. Las enfermedades ocasionadas por virus, hongos y bacterias amenazan las producciones cítricas liquidando millones de árboles. La propagación de plantas libres de patógenos es una prioridad. Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología para establecer segmentos nodales de lima ácida *in vitro* y evaluar el efecto de citoquininas en la formación de brotes axilares. Se utilizó un diseño completo al azar con cuatro tratamientos, tres repeticiones y 20 unidades experimentales por cada tratamiento. Los tratamientos correspondieron al medio de cultivo basal de Murashige y Skoog suplementado con 0.25 mg/L de BAP; 0.25 mg/L de kinetina; 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de kinetina y un testigo sin hormonas. Se evaluó el porcentaje de explantes con brote y el promedio de brotes por explante en cada tratamiento. Las variables fueron analizadas hasta el día 28 en que culminó la etapa de establecimiento. Los mejores resultados corresponden al medio basal de Murashige y Skoog suplementado con 0.25 mg/L de BAP que dio 78% de explantes con brote y un promedio de dos brotes por explante y el medio suplementado con 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de kinetina que dio 70% de explantes con brote y un promedio de 1.4 brotes por explante con los cuales se logró establecer segmentos nodales de lima ácida.

Palabras clave: Brotes axilares, citoquininas, establecimiento, micropropagación.

Abstract. Acid lime belongs to the family Rutaceae and produced in tropical and subtropical climates. Diseases caused by viruses, fungi and bacteria are threats to citrus production and affect the development of the industry liquidating millions of trees. The propagation of pathogen-free plants is a priority. The research was performed in the Tissue Plant Culture Laboratory of the Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. The aim of this study was develop a methodology to establish nodal segments of lime *in vitro* and evaluate the effect of cytokinins on the formation of axillary shoots. A Completely Randomized Design was used with four treatments, three repetitions and 20 experimental units. The treatments corresponded to the basal culture medium of Murashige and Skoog medium supplemented with 0.25 mg/L of BAP; 0.25 mg/L of kinetin; 0.25 mg/L of BAP + 0.25 mg/L kinetin and control without phytohormones. The percentage of explants per treatment and the average bud shoots per explant were evaluated. The variables were analyzed until day 28 in which culminated the establishment stage. The best results for this step corresponds to semisolid medium Murashige and Skoog supplemented with 0.25 mg/L BAP that gave 78% of explants with bud and medium supplemented with 0.25 mg/L of BAP + 0.25 mg/L of KIN that gave 70% of explants with bud. With these we could establish *in vitro* nodal segments of lime.

Key words: Axillary buds, cytokinins, establishment, micropropagation.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4 CONCLUSIONES.....	10
5 RECOMENDACIONES.....	11
6 LITERATURA CITADA.....	13
7 ANEXOS	14

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de lima ácida (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swing.)	5
2. Efecto de fitohormonas en la formación de brotes y número de brotes por explante de lima ácida (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swing.) durante la etapa de establecimiento, utilizando el medio de Murashige y Skoog modificado	7

Figuras	Página
1. Obtención del segmento nodal de lima ácida -variedad Tahití-.....	3
2. Proceso de desinfección de segmentos nodales de lima ácida -variedad Tahití-.....	4
3. Preparación de segmento nodal de lima ácida y siembra <i>in vitro</i>	6
4. Efecto de fitohormonas en segmentos nodales de lima ácida establecidos <i>in vitro</i> a los 28 días de siembra.....	9

Anexos	Página
1. Contaminación ocasionada por bacterias y hongos en los explantes de lima ácida.....	14

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son árboles frutales ampliamente distribuidos y consumidos en el mundo con gran importancia económica. Las limas ácidas y limones se diferencian de otras variedades de cítricos por el hecho de que se consumen normalmente con otros alimentos y son producidos principalmente para el mercado de productos frescos constituyendo un rubro importante en la economía con una producción aproximada de 15 millones toneladas a nivel mundial (FAOSTAT 2013).

La lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swing.) pertenece a la familia Rutaceae, es originaria de Asia y tiene hábito de crecimiento perenne. Presenta una copa abierta, espinas en cada yema lateral, hojas unifoliadas medianas y peciolo pequeño, inflorescencias blancas pequeñas con cinco pétalos, su fruto es de color verde intenso, gran tamaño y se denomina hesperidio. La producción está situada en climas tropicales y subtropicales (Pérez 2013).

La lima ácida se ve afectada por plagas y enfermedades que constituyen amenazas para las producciones cítricas y afectan el desarrollo de la industria liquidando millones de árboles. Dentro de las enfermedades principales se destacan: *Phytophthora* sp. causada por un oomiceto, los virus: de la tristeza de los cítricos (CTV), psorosis (CPsV) y exocortis (CEV) que reducen el uso de determinado portainjertos, la calidad y producción de la fruta. Otras enfermedades como canchosis causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. citri y la bacteria *Candidatus liberobacter*, esta última trasmite el Huanglongbing (HLB) que afecta a todas las variedades de cítricos y perjudica las producciones eliminando poblaciones enteras de árboles (Peña 2010).

En la actualidad la enfermedad de tipo letal que más estragos causa en la producción de cítricos es el Huanglongbing HLB que afecta a más de 63 millones de cítricos en Asia y África y causa un elevado impacto económico en todos los países, en Honduras se calcula que alrededor del 30% de las plantaciones cítricas se encuentran afectadas (FAO 2014). Los citricultores para obtener una mejoría en la productividad deben conseguir material libre de patógenos y usarlo en conjunto con prácticas que ayuden a reducir la incidencia de los mismos. Este material se puede conseguir mediante explantes regenerados *in vitro* (Chirinos y Pérez 1999).

La lima ácida como la mayoría de los cítricos responde muy bien a cultivo de tejidos *in vitro* (Peña 2010). Se añade citoquininas para conseguir extensión y división celular lo cual está ligado al tipo de explante y la especie vegetal. Los segmentos nodales tienen facilidad de regeneración comparados con explantes más pequeños como los meristemas, estos últimos tienen una superficie lesionada relativamente mayor y se requieren

estrategias que contribuyan a su recuperación y regeneración (Ayerbe 1990), además se obtiene la ventaja de que no existe reversión a estados juveniles de las plántulas producidas.

- El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología para establecer segmentos nodales de lima ácida *in vitro* y evaluar el efecto de citoquininas en la formación de brotes axilares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. El estudio se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería Agronómica del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Material vegetal y fuente de explante. Se utilizaron segmentos nodales provenientes de varetas de árboles de lima ácida -variedad Tahití- procedentes de la plantación de cítricos de Zamorano ubicada en la vega del río Yeguaré (13°59'36"N 86°59'26"E). En el segmento nodal se encuentra el meristemo de crecimiento (Figura 1).



Figura 1. Obtención del segmento nodal de lima ácida -variedad Tahití-, A) planta madre, B) remoción de hojas para obtener vareta, C) clasificación de varetas, D) corte individual del segmento nodal que contiene el meristemo.

Desinfección del material vegetal. Las varetas se desinfectaron superficialmente, se lavaron por dos ocasiones con agua potable y jabón con un cepillo de cerdas suaves para eliminar sedimentos y partículas grandes. Se cortaron en segmentos nodales (1.5 – 2.0 cm). Posterior a esto se sumergieron en alcohol al 70% durante 20 segundos y luego en una solución de NaClO al 15% (v/v) (hipoclorito de sodio al 4.5% de ingrediente activo) con dos gotas de Tween 80 por cada 100 mL de solución, durante 15 minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar se extrajo la solución de NaClO y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril (Figura 2).

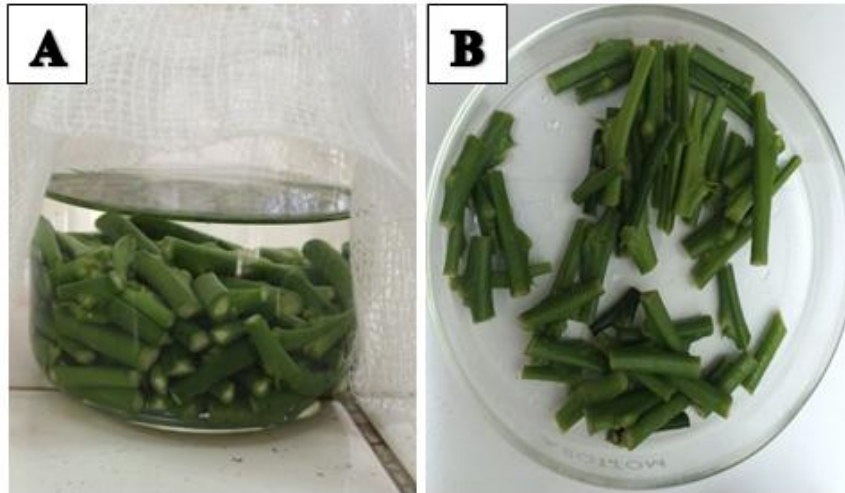


Figura 2. Proceso de desinfección de segmentos nodales de lima ácida - variedad Tahití -. A) explantes sumergidos en solución de NaClO al 15% durante 15 minutos, C) explantes listos para la siembra.

Preparación de los medios de cultivo. Se evaluó el medio de Murashige y Skoog (Cuadro 1), suplementado con reguladores de crecimiento utilizados con éxito en estudios relacionados:

- Tratamiento 0.25 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina) (Tallón *et al.* 2012)
- Tratamiento 0.25 mg/L de Kinetina (6-furfurilaminopurina) (Savita *et al.* 2012)
- Tratamiento 0.25 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina) + 0.25 mg/L de Kinetina (6-furfurilaminopurina) (Sangeeta y Vibha 2010)
- Testigo sin fitohormonas

Para elaborar los medios de cultivo semisólidos se utilizó agua destilada. Se adicionó PPM[®] (Plant Preservative Mixture) (3 mL/L) que es un biocida dirigido a controlar bacterias y hongos evitando la contaminación del tejido vegetal (Plant Cell Technology 2014). Se ajustó el pH a 5.8 utilizando KOH y/o HCL, se agregó Phytigel[®] (1.8 g/L) como agente gelificante. Se fraccionó el medio de cultivo en frascos individuales de 100 mL con 10 mL de medio de cultivo en cada uno. Los frascos se sellaron con papel aluminio y esterilizaron en autoclave a 15 PSI, 120°C durante 20 minutos.

Preparación y siembra del material vegetal utilizado. La cámara de flujo laminar fue desinfectada con alcohol al 70%, los instrumentos (pinzas, bisturís) se esterilizaron a 250 °C en el esterilizador de calor seco. Se extrajo la porción vegetal a sembrar y se hicieron dos cortes: a 1.0 cm por debajo del meristemo y a 0.3 cm por encima. Los explantes cortados se colocaron con su parte basal en contacto con el medio de cultivo. Los frascos se hermetizaron con cinta sellante (Figura 3). Los medios con el explante se incubaron en el cuarto de crecimiento a 22°C, 60% de humedad relativa y 16 horas luz (Silvanya Daylight[®] Incandescent 75 W) con intensidad lumínica de 2000 Lux.

Cuadro 11. Medio basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swing.)

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.400
		Ácido Nicotínico	0.500
		Piridoxina	0.500
		Sacarosa	30,000.000

Fuente: Roca y Mroginski (1991).

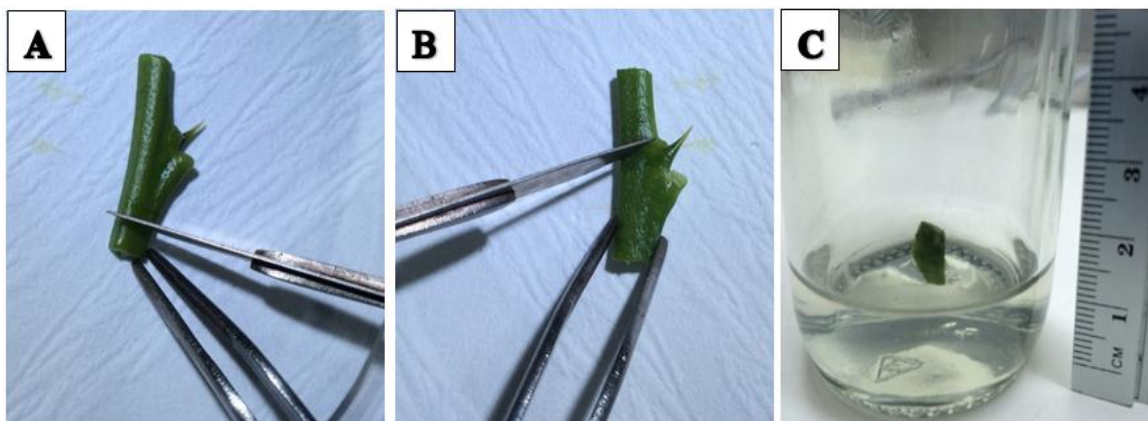


Figura 3. Preparación de segmento nodal de lima ácida y siembra *in vitro*. A) corte a 1.0 cm bajo el meristemo, B) corte a 0.3 cm por encima del meristemo, C) ubicación del explante en el medio de cultivo.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA) con cuatro tratamientos, tres repeticiones y cada repetición con 20 unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza ANDEVA, y una separación de medias con el método de DUNCAN con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3[®]).

Variables analizadas. Se evaluó el porcentaje de explantes con brote y el promedio de brotes por explante en cada tratamiento. Las variables fueron evaluadas cada cinco días y hasta el día 28 en que culminó la etapa de establecimiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sobrevivencia de los explantes fue del 44%, el 56% presentó contaminación por hongos y bacterias. Los segmentos nodales asépticos permitieron el desarrollo adecuado de los brotes. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la producción de brotes (Cuadro 2).

El medio de cultivo suplementado con 0.25 mg/L de BAP presentó 78% de explantes con brotes. Según Pérez (2013) en un estudio realizado en *Citrus latifolia* obtuvo brotación 96% de segmentos nodales sin formación de entrenudos y formación de brotes laterales. Esto porque la citoquinina BAP en bajas concentraciones estimula la división celular, induce la formación de vástagos adventicios, inhibe la formación de raíces y disminuye la dominancia apical (Ayerbe 1990). La formación de hojas por brote fue de cinco en promedio y no hay diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 2. Efecto de fitohormonas en la formación de brotes y número de brotes por explante de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swing.) durante la etapa de establecimiento, utilizando el medio de Murashige y Skoog modificado.

Tratamiento (mg/L)	Unidades experimentales (n)	Explantes con brote (%)	Promedio del N° de brotes por explante
0.25 BAP ^ψ	24	78 ^{a§}	2.0 ^{a§}
0.25 KIN ^ω	23	34 ^b	1.2 ^b
0.25 BAP + 0.25 KIN	29	70 ^a	1.4 ^a
Testigo sin fitohormonas	22	29 ^b	1.0 ^b

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$)

^ψ BAP = 6-bencilaminopurina

^ω KIN = kinetina (6-furfurilaminopurina)

El medio suplementado con 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de KIN estadísticamente no es diferente con el medio suplementado únicamente con 0.25mg/L de BAP. Presentó 70% de explantes con brotes. En este caso presentó un efecto desfavorable al esperado, ya que se usó la misma concentración de BAP que en adición con KIN se esperaba sea potenciador en cuanto a brotación.

Este resultado coincide con Sangeeta y Vibha (2010) quienes comprobaron que el uso de KIN asociado con BAP disminuye el efecto que tendría BAP por sí sola en la formación de brotes para la propagación *in vitro* de citrumelo (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*). El mismo resultado obtuvieron (Tallón *et al.* 2012) quienes evaluaron el efecto de KIN en adición con BAP en el establecimiento de mandarina -cleopatra- (*Citrus reticulata*) y no encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas en comparación con los resultados obtenidos cuando se usó solo BAP en el medio de cultivo. La producción de hojas promedio por brote fue de cinco al día 28.

El medio de cultivo al cual se adicionó 0.25 mg/L de KIN presentó 34% de explantes con brotes. Lo cual se debe a que el precursor KIN por sí solo tiene actividad muy limitada. Estos resultados concuerdan al estudio realizado por Roca y Mroginski (1991) en zanahoria quienes evaluaron el incremento del peso fresco por aumento de actividad celular inducida por los promotores adicionados y concluyen que el uso de KIN únicamente es efectivo si se complementa con AIA (Ácido indolacético), su efecto individual es insignificante. La formación de hojas promedio fue de seis por brote al día 28.

El testigo sin fitohormonas presentó 29% de explantes con brotes, los cuales formaron un brote por explante debido a que cada segmento nodal puede presentar respuestas diferentes relacionadas al nivel interno de citoquinas. Ayerbe (1990) señala que hay explantes que producen suficientes cantidades de fitohormonas y no necesitan cantidades adicionales para conseguir elongación o división celular. La formación de hojas al día 28 fue de cinco en promedio (Figura 4).

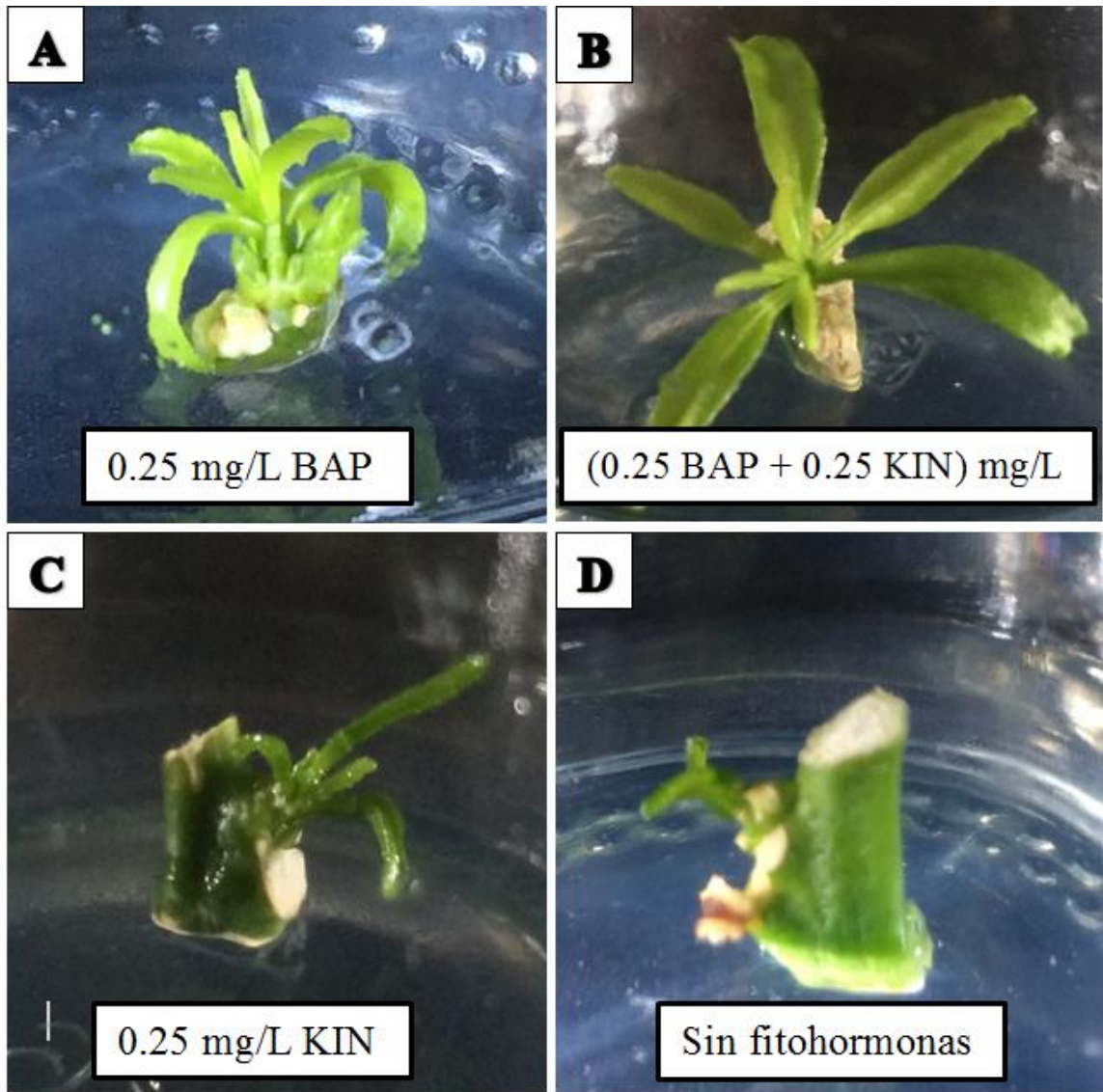


Figura 4. Efecto de fitohormonas en segmentos nodales de lima ácida establecidos *in vitro* a los 28 días de siembra.

4. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología para establecer segmentos nodales de lima ácida *in vitro* y evaluó el efecto de citoquininas en la formación de brotes axilares. Los mejores resultados se obtuvieron con 0.25 mg/L de BAP y con 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de KIN.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar con la etapa de multiplicación para determinar el medio adecuado.
- Usar con preferencia explantes provenientes de invernaderos donde las condiciones sanitarias sean controladas para prevenir la manifestación de patógenos en el cultivo *in vitro*.
- Usar técnicas como la termoterapia para eliminar patógenos de tejidos contaminados.

6. LITERATURA CITADA

Ayerbe, L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Madrid, España, Ediciones Mundi-Prensa. 326 p.

Chirinos, F. y E. Pérez. 1999. Biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales. Venezuela, IICA. 115p. Consultado 22 de Agosto de 2014. Disponible en http://books.google.hn/books?id=NZEgAQAAIAAJ&dq=in+vitro+micropropagacion+of+citrus&lr=&source=gbs_navlinks_s

FAO. 2014. Consultado 15 de Septiembre de 2014. Disponible en <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/en/c/235991/>

FAOSTAT. 2013. Consultado 21 de Agosto de 2014. Disponible en <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>

Peña, L. 2010. Cítricos (*Citrus sp.*). In: Perea M., L. Matallana, A. Tirado. Biotecnología aplicada a la mejora de los cultivos de frutas tropicales. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. p 444-465.

Pérez, A. 2013. Efecto de precursores y reguladores de crecimiento en la formación de brotes adventicios a partir de explantes de limón persa. Tesis Mag. Sci., Texcoco, México. Montecillo. 151 p. Consultado 19 de Junio de 2014. Disponible en http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/2025/Perez_Luna_AI_MC_Fructicultura_2013.pdf?sequence=1

Plant Cell Technology. 2014. Consultado 18 de Julio de 2014. Disponible en <http://www.plantcelltechnology.com/about-ppm/>

Roca, W. y L. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de la Agricultura Tropical). 969 p.

Sangeeta, S. y D. Vibha. 2010. Development of a Highly Efficient Micropropagation Method for the *Citrus rootstock* 'Swingle' Citrumelo [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *C. paradisi* McFaden]. International Journal of Fruit Science 10:65–78.

Savita, A. Bhagat, P. Pati, G. Virk y A. Nagpal. 2012. An efficient micropropagation protocol for *Citrus jambhiri* Lush. and assessment of clonal fidelity employing anatomical studies and RAPD markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 48:512–520.

Tallón, C., I. Porras y O. Pérez-Tornero. 2012. Efficient propagation and rooting of three *Citrus rootstocks* using different plant growth regulators. *In: In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 48:488–499

7. ANEXOS

Anexo 1. Contaminación ocasionada por bacterias y hongos en los explantes de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swing.) en la etapa de establecimiento *in vitro*.

	No.	%
Total frascos sembrados	240	100
Asépticos	98	41
Contaminación	142	59