

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Evaluación de protocolo de microinjertación de limón persa (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.)

Estudiante

Raúl Alejandro Barahona Reyes

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Cinthya Martínez, M.A.E.

Honduras, julio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	13
Metodología Establecimiento de Meristemas <i>in vitro</i>	13
Ubicación	13
Fuente del Material Vegetal	13
Medio de Cultivo.....	13
Protocolo de Establecimiento de Meristemas <i>in vitro</i>	14
Preparación del Material Vegetal	14
Desinfección del Material Vegetal	15
Extracción de Meristemas.....	15
Incubación.....	16
Metodología Germinación del Portainjerto.....	17
Fuente del Material Vegetal Portainjerto.....	17
Medio de cultivo	17
Preparación y Desinfección de las Semillas	18
Incubación.....	18
Metodología de Microinjertación.....	19
Medio de Cultivo.....	19

Protocolo de Microinjertación.....	19
Incubación.....	20
Crecimiento y Eliminación de Brotes Adventicios en el Portainjerto	21
Variables Evaluadas	21
Resultados y Discusión.....	22
Establecimiento de Meristemas de Limón Persa <i>in vitro</i>	22
Germinación del Portainjerto Carrizo citrange	23
Microinjertos de Limón Persa y <i>Carrizo citrange</i>	25
Conclusiones	28
Recomendaciones.....	29
Referencias.....	30
Anexos.....	32

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de cultivo basal MS modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de limón persa (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swingle).....	13
Cuadro 2 Medio de cultivo basal MS modificado para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de Carrizo citrange	18
Cuadro 3 Medio de cultivo basal MS modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de microinjertos de limón persa (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swingle.) en patrones de Carrizo citrange	19

Índice de Figuras

Figura 1 Selección y preparación de material vegetal	14
Figura 2 Meristemas de limón extraídos	16
Figura 3 Meristemas de limón establecidos <i>in vitro</i> en tubos de ensayo y ubicados en el cuarto de crecimiento	17
Figura 4 Proceso de microinjertación	20
Figura 5 Eliminación de brotes adventicios en el portainjerto	21
Figura 6 Meristemas incubados por 20 días	22
Figura 7 Semilla de <i>Carrizo citrange</i>	24
Figura 8 Efectos de la falta de presión en el punto de unión injerto-patrón	25
Figura 9 Desprendimiento de los meristemas por tiempo de incubación prolongado	26

Índice de Anexos

Anexo A Protocolo de microinjertación de limón persa en el portainjerto <i>Carrizo citrange</i>	32
---	----

Resumen

El cultivo de tejidos se define como el conjunto de técnicas de establecimiento *in vitro*, haciendo uso de una porción de tejido vegetal con el objetivo de ser utilizado en diferentes aplicaciones, como la obtención de plantas libres de patógenos y la propagación rápida y masiva de plantas. Los objetivos de estudio fueron evaluar un protocolo de microinjertación para el cultivo de limón persa en patrones de *Carrizo citrange*, establecer *in vitro* meristemas de limón persa y germinar *in vitro* semillas de *Carrizo citrange*. El estudio se realizó en tres etapas, la primera fue establecer los meristemas de limón persa, que sirvieron como púa. La segunda etapa fue la germinación del portainjerto *Carrizo citrange* y la última etapa consistía en realizar el proceso de microinjertado, utilizando los protocolos publicados por Volk, Krueger *et al.* (2020) y Volk, Bonnart *et al.* (2020). Se evaluó el porcentaje de meristemas establecidos, porcentaje de germinación del portainjerto y porcentaje de pegue del microinjerto a las dos semanas. Los meristemas y microinjertos fueron incubados bajo condiciones de 21 °C, 30% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 16 horas y una radiación fotosintéticamente activa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Las semillas fueron incubadas bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, con la diferencia de que no se expusieron a la luz. Se logró exitosamente el establecimiento *in vitro* de los meristemas de limón persa y la germinación *in vitro* de las semillas de *Carrizo citrange*, pero no se logró el pegue del microinjerto de limón persa en el portainjerto *Carrizo citrange*.

Palabras clave: semillas, *in vitro*, limón, meristemas, microinjertación.

Abstract

Tissue culture is defined as the set of *in vitro* establishment techniques, making use of a portion of plant tissue with the objective of being used in different applications, such as obtaining pathogen-free plants and the rapid and massive propagation of plants. The objectives of the study were to evaluate a micrografting protocol for the cultivation of Persian lime on *Carrizo citrange* rootstocks, to establish *in vitro* Persian lime meristems and to germinate *in vitro* *Carrizo citrange* seeds. The study was conducted in three stages, the first was to establish the Persian lime meristems, which served as scions. The second stage was the germination of the *Carrizo citrange* rootstock and the last stage consisted of performing the micrografting process, using the protocols published by Volk, Krueger *et al.* (2020) and Volk, Bonnart *et al.* (2020). The percentage of established meristems, percentage of rootstock germination and percentage of micrograft attachment at two weeks were evaluated. Meristems and micrografts were incubated under conditions of 21 °C, 30% relative humidity, with a 16-h photoperiod and a photosynthetically active radiation of 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Seeds were incubated under the same temperature and humidity conditions, except that they were not exposed to light. *In vitro* establishment of Persian lime meristems and *in vitro* germination of *Carrizo citrange* seeds were successfully achieved, but the attachment of the Persian lime micrograft to the *Carrizo citrange* rootstock was not achieved.

Keywords: seeds, *in vitro*, lime, meristems, micrograft.

Introducción

El limón persa (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) comúnmente llamado limón de injerto, limón sin semilla o limón Tahití o limón persa. Es un árbol perenne de la familia *Rutaceae* del género *Citrus*, originario del sureste de Asia, específicamente el sur de China. Distribuido a nivel mundial en las tierras bajas y cálidas de las regiones subtropicales, siendo los continentes americano y asiático sus principales productores que representan 84.53% en la producción mundial de limones y limas. Ubicando a India, México, China y Argentina como los principales países productores. Según la FAO (2021) la producción mundial de limones y limas en 2019 fue aproximadamente de 20.6 millones de toneladas, representando un 14% de la producción mundial de cítricos y mostrando notablemente un incremento de 5.45 millones de toneladas en los últimos 10 años, específicamente en el periodo del año 2011-2019.

El tipo de propagación que ha sido utilizada para el limón persa es de forma asexual o vegetativa, ya que este no tiene semilla y la técnica más utilizada ha sido el injertado. Sin embargo, al momento de llevar a cabo esta técnica se presentan diversos problemas como la incompatibilidad que se puede presentar en las diferentes etapas del injerto a nivel del punto de unión injerto-patrón y principalmente el uso de yemas o material vegetativo contaminado que sirven como entrada de patógenos a una plantación. Además, esta técnica requiere de un área extensa para propagar, mucha experiencia práctica y puede verse limitada según la época del año (Mendez et al. 2020).

En consecuencia, los principales países productores de cítricos con el objetivo de reducir problemas fitosanitarios y optimizar sus producciones han empezado a desarrollar e implementar técnicas de cultivo de tejidos, que se definen como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo, en condiciones asépticas, de órganos, tejidos, células y protoplastos, en medios nutritivos artificiales y bajo estricto control del ambiente de incubación para ser utilizado en diferentes aplicaciones. Estas técnicas brindan muchas ventajas como la obtención de plantas idénticas a la planta madre, rápida

proliferación de brotes, homogeneidad en el número de brotes producidos, espacio mínimo requerido para propagar y reducción de problemas fitosanitarios.

Conviene subrayar que el objetivo principal de utilizar estas técnicas es la producción de material de planta madre. Estas técnicas ayudan en asegurar la salud y el cumplimiento de reglas fitosanitarias en las producciones. La importancia de estas técnicas se ve reflejada en proyectos de cooperación entre países e instituciones, programas de certificación y distribución de plantas, el cumplimiento del control y reglamentos fitosanitarios en todos los países.

Una de las técnicas de cultivo de tejidos para producir plantas sanas en patrones resistentes es el microinjertado, la cual consiste en transferir el meristema de una planta a una raíz en condiciones *in vitro*, donde el meristema sería la púa y la raíz el portainjerto. El uso de esta técnica nos puede brindar beneficios en la detección y eliminación de enfermedades virales en plantas, mejoras en los estudios de incompatibilidades entre material de púa y portainjerto y el estudio de aspectos histológicos y fisiológicos del injerto (Navarro 1988).

De los diferentes portainjertos que podemos encontrar, los más populares y utilizados han sido los *citranges*. Estos son híbridos de naranja dulce y naranja trifoliada, entre los cuales podemos encontrar el *Carrizo citrange*. El *Carrizo citrange* empezó a ser producido masivamente en Florida, EE. UU. a inicios del año 1900, con el objetivo de obtener cultivares de naranja dulce resistentes al frío. Sin embargo, estos demostraron ser mejores como portainjertos. La popularidad de estos híbridos se debe principalmente a su tolerancia y resistencia a diferentes condiciones de suelo, clima y presencia de enfermedades como el CTV (virus de la tristeza de los cítricos), Gomosis (*Phytophthora spp.*) y Xiloporosis (*Cachexia xyloporosis*) (Castle et al. 1993). Además, diferentes estudios como el de Skewes (2017) han evidenciado que son portainjertos compatibles con la mayoría de cultivares de cítricos y que tienen la característica de presentar hipocótilos gruesos que facilitan la injertación.

En definitiva, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos y el desarrollo de protocolos para producir plantas libres de patógenos, se ha vuelto clave para las producciones vegetales a nivel mundial y el desarrollar investigaciones en este tema son de gran aporte para la fitotecnia y las producciones agrícolas.

Los objetivos de estudio fueron evaluar un protocolo de microinjertación para el cultivo de limón persa en patrones de *Carrizo citrange*, establecer *in vitro* meristemas de limón persa y germinar *in vitro* semillas de *Carrizo citrange*.

Materiales y Métodos

Metodología Establecimiento de Meristemas *in vitro*

Ubicación

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Fuente del Material Vegetal

Para la púa se utilizó material vegetal de limón persa (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) de los árboles de producción comercial de la Unidad de Frutales ubicados en Zona 2.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el publicado por Al-Khayri y Al-Bahrany (2021) (Cuadro 1). Ajustado a un pH de 5.8, solidificado con Phytigel® y esterilizado en autoclave a 121 °C, 1 kg/cm² por 20 minutos.

Cuadro 1

Medio de cultivo basal MS modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de limón persa (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle)

Componentes	1L	
Macroelementos MS (10X)	100.0	mL
Microelementos MS (1000X)	1.0	mL
FeNaEDTA	50.0	mg
Inositol	0.1	g
Tiamina	1.0	mg
Ácido Nicotínico	1.0	mg
Piridoxina	1.0	mg
Glicina	2.0	mg
Pantotenato de Ca	5.0	mg
BA	1.0	mg
Sacarosa	30.0	g
pH 5.8		

Phytigel	1.8	g
----------	-----	---

Nota. Adaptado de Al-Khayri y Al-Bahrany (2021)

Protocolo de Establecimiento de Meristemas in vitro

El protocolo utilizado para el proyecto fue el publicado por Volk y Krueger et al. (2020) el cual se adaptó perfectamente a esta investigación y posee el procedimiento detallado de la extracción y establecimiento de meristemas.

Preparación del Material Vegetal

Se seleccionaron esquejes de árboles que presentaban tejido joven, de color verde claro, con hojas totalmente extendidas, de turgencia levemente suave y que tuvieran sus meristemas sin brotar (Figura 1). Usando tijeras desinfectadas con una solución de agua y 20% hipoclorito de sodio (cloro líquido NaOCl 4.78% de ingrediente activo) se cortaron segmentos de 10 cm de largo y se le removieron las hojas y espinas. Seguidamente, se cortaron en secciones de 3 cm de largo con 1-2 meristemas, siguiendo el protocolo descrito por Ojeda Ayala (2020).

Figura 1

Selección y preparación de material vegetal



Nota. A) esqueje de 10cm; B) corte de los esquejes en secciones de 3 cm.

Desinfección del Material Vegetal

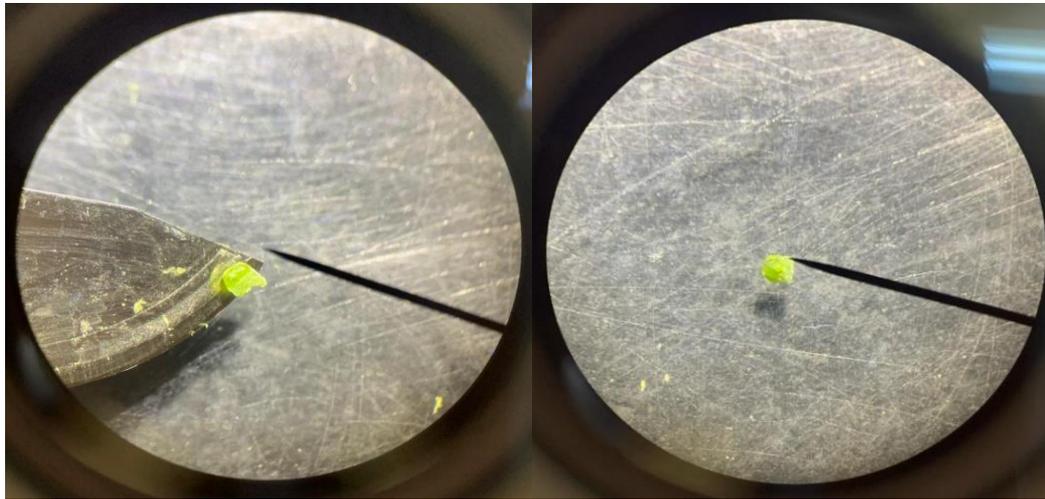
El material preparado se sumergió en una solución de agua y Tween®80 (1 gota por 100 mL de agua) durante 10 minutos. A continuación, al material se le hizo tres enjuagues con agua potable y se desinfectaron con alcohol al 70% durante 2 minutos, más otros tres enjuagues con agua potable. Finalmente, el material se sumergió en una solución de 10% hipoclorito de sodio (cloro líquido NaOCl 4.78% de ingrediente activo) y una gota de Tween®80 durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Extracción de Meristemas

La extracción de meristemas se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, con herramientas previamente desinfectadas con alcohol al 70% y esterilizadas a 350°C por 15 segundos. Primero, se hicieron dos incisiones longitudinales y dos incisiones transversales a los lados del brote que se le extraería el meristema (Figura 2). A continuación, con ayuda de pinzas se removió con cuidado los primordios foliares que recubrían el meristema, una vez expuesto se fue cortando el tejido sobrante y dejando únicamente el meristema. Finalmente, se extrajo el meristema haciendo un corte final en la parte basal de este, obteniendo un material con una medida aproximada de 1-1.5 mm de grosor. Habiendo exitosamente extraído los meristemas, se sembraron en tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo estéril.

Figura 2

Meristemas de limón extraídos



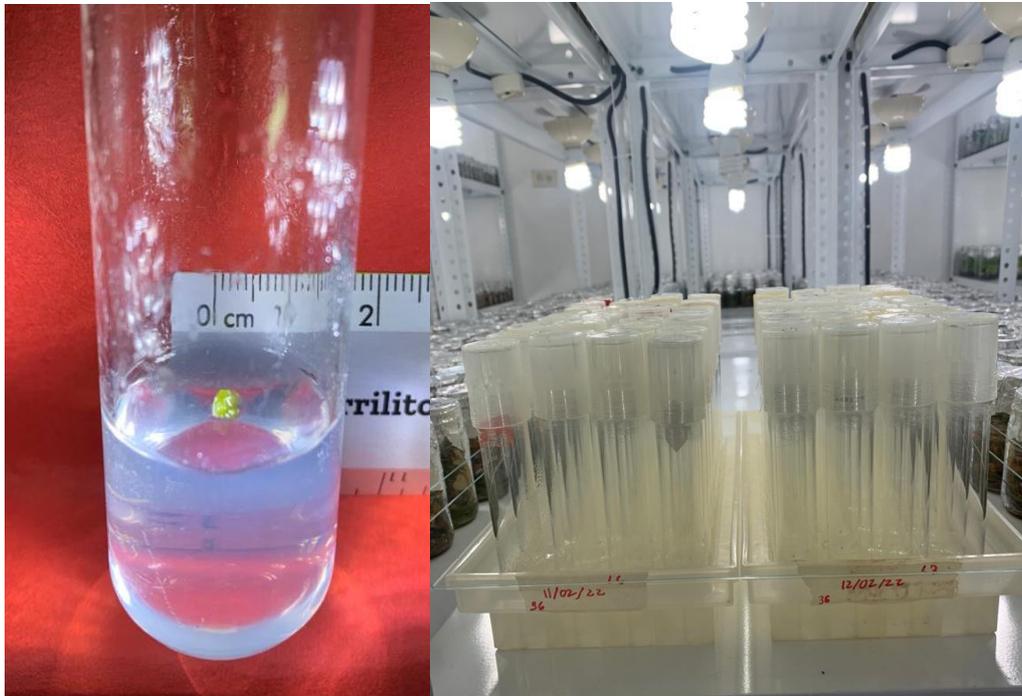
Nota. Se utilizó un aumento de 10x en el estereoscopio.

Incubación

Los cultivos establecidos se etiquetaron debidamente y se ubicaron en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de incubación, asegurando 21°C, 30% de humedad relativa, periodo de luz de 16 horas y periodo de oscuridad de 8 horas, con una radiación fotosintéticamente activa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Figura 3). Los explantes sembrados fueron monitoreados cada 4 días, con el objetivo de ir observando su crecimiento, desarrollo y para la eliminación de explantes contaminados.

Figura 3

Meristemas de limón establecidos in vitro en tubos de ensayo y ubicados en el cuarto de crecimiento



Metodología Germinación del Portainjerto

Fuente del Material Vegetal Portainjerto

Para el patrón del microinjerto se utilizaron raíces de semillas de *Carrizo citrange*, proporcionadas por la unidad de propagación de plantas de Zamorano. Esta semilla fue comprada a los viveros de UNAH-CURLA ubicados en La Ceiba, Honduras.

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el publicado por Volk y Bonnard (2019) (Cuadro 2). El cual fue ajustado a un pH de 5.8, solidificado con Phytigel® 1.8 g/L y esterilizado en autoclave a 121°C, 1 kg/cm² por 20 minutos.

Cuadro 2

Medio de cultivo basal MS modificado para la germinación in vitro de semillas de Carrizo citrange

Componentes	1L	
Macroelementos MS (10X)	100.0	mL
Microelementos MS (1000X)	1.0	mL
FeNaEDTA	50.0	mg
Inositol	0.1	g
Sacarosa	30.0	g
pH 5.8		
Phytigel	1.8	g

Nota. Adaptado de (Volk y Bonnart 2019)

Preparación y Desinfección de las Semillas

Se utilizaron raíces de semillas de *Carrizo citrange* como portainjerto debido a su disponibilidad y su compatibilidad con el material vegetal utilizado para la púa. En primer lugar, se quitó la testa de las semillas y se colocaron en una solución de agua y Tween®80 (1 gota por 100 mL) durante 10 minutos y luego se enjuagaron tres veces con agua potable. En segundo lugar, las semillas se sumergieron en alcohol al 70% durante 2 minutos y luego se volvieron a enjuagar tres veces con agua potable. A continuación, las semillas se sumergieron en una solución de 20% hipoclorito de sodio (cloro líquido NaOCl 4.78% de ingrediente activo) y Tween®80 (1 gota por 100 mL) durante 20 minutos. Luego las semillas se trasladaron a la cámara de flujo laminar, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se colocaron en tubos de ensayo conteniendo medio de germinación.

Incubación

Para terminar, se ubicaron las semillas sembradas en el cuarto de crecimiento y se incubaron en completa oscuridad a 21 °C y 30% de humedad relativa durante 3 semanas.

Metodología de Microinjertación

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el publicado por Volk y Bonnart (2019) (Cuadro 3). El cual fue ajustado a un pH de 5.8, solidificado con Phytigel® 1.8 g/L y esterilizado en autoclave a 121 °C, 1kg/cm² por 20 minutos.

Cuadro 3

Medio de cultivo basal MS modificado para el establecimiento in vitro de microinjertos de limón persa (Citrus aurantiifolia [Chrism.] Swingle.) en patrones de Carrizo citrange

Componentes	1L	
Macroelementos MS (10X)	100.0	mL
Microelementos MS (1000X)	1.0	mL
FeNaEDTA	50.0	mg
Inositol	0.1	g
Tiamina	0.1	mg
Ácido Nicotínico	5.0	mg
Piridoxina	1.0	mg
Glicina	3.0	mg
Sacarosa	75.0	g
pH 5.8		
Phytigel	1.8	g

Nota: Adaptado de Volk y Bonnart (2019).

Protocolo de Microinjertación

El protocolo se desarrolló utilizando como base el publicado por Volk y Bonnart et al. (2020) el cual posee el procedimiento detallado de la realización de microinjertos en cítricos.

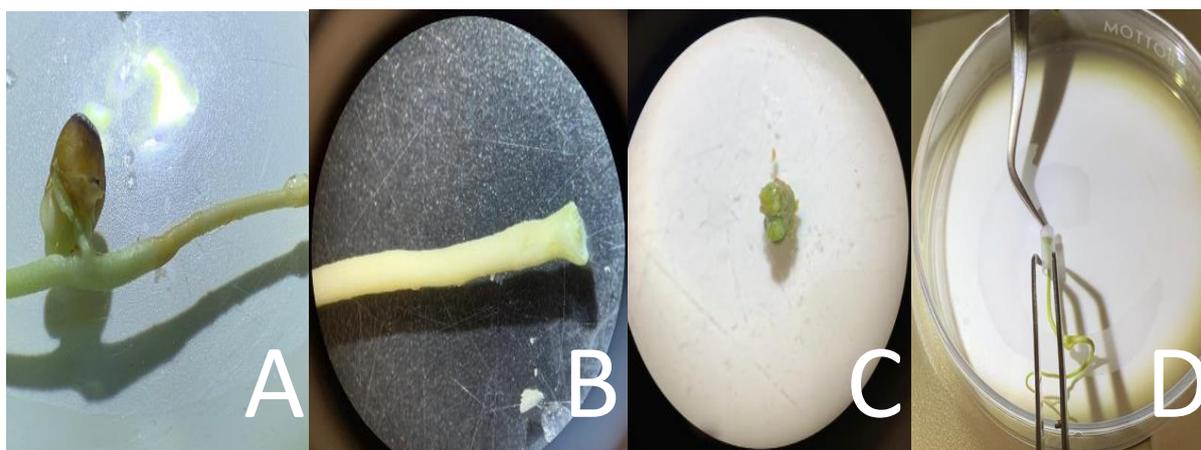
En la cámara de flujo laminar se desinfectó un microscopio con alcohol desnaturalizado al 70%, se preparó un cilindro con platos Petri estériles, se cortaron y desinfectaron segmentos de tubo de catéter de poliuretano de aproximadamente 1cm de longitud (el protocolo de desinfección fue el mismo utilizado para el material vegetal de púa) y las herramientas utilizadas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70%, y esterilizadas a 350°C por 15 segundos.

Para empezar, para los patrones se seleccionaron las semillas germinadas que tuvieran una medida de 6-8 cm de largo, estas fueron removidas de los tubos de ensayo y colocadas en un plato Petri para poder cortarlas transversalmente separando la parte aérea y dejando solamente la parte radicular. Seguidamente esta raíz recortada se introdujo dentro de un segmento de tubo de infusión (Figura 4).

A continuación, el material para púa (meristema) sembrado, se extrajo del tubo de ensayo y se colocó en el mismo plato Petri. Se le cortó aproximadamente 0.2 mm de su parte basal, para luego introducirlo en el segmento de tubo de infusión con la raíz en el otro extremo y así fijar el punto de unión injerto-patrón (Figura 4).

Figura 4

Proceso de microinjertación



Nota. A) extracción del portainjerto germinado; B) corte transversal del portainjerto; C) corte basal de la púa; D) unión de ambos tejidos.

Incubación

El material microinjertado se colocó en tubos de ensayo conteniendo medio para el establecimiento *in vitro* de microinjertos, dejando unos 3cm del material microinjertado sobre la superficie del medio. Se incubaron durante 6 semanas bajo condiciones de 21°C, 30% humedad relativa, con un fotoperiodo de 16 horas y una radiación fotosintéticamente activa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

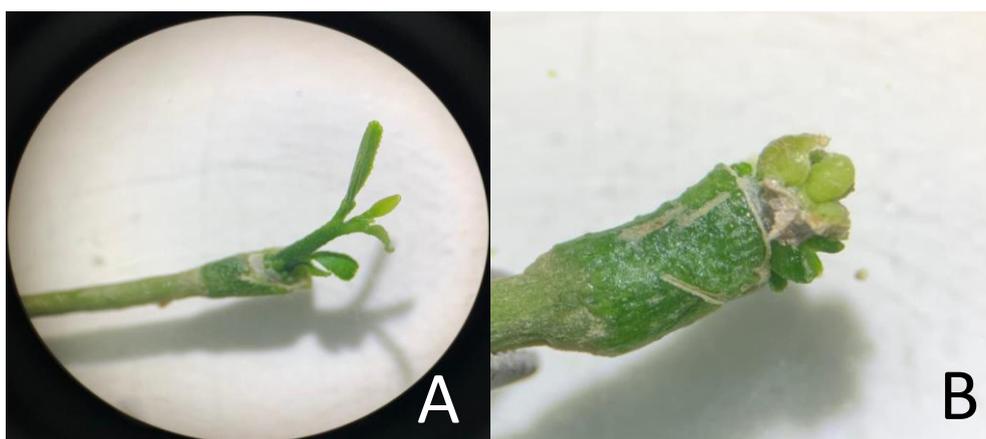
Los microinjertos se monitorearon cada 4 días, con el objetivo de observar su crecimiento, el desarrollo del callo en el punto de unión injerto-patrón y para la eliminar microinjertos contaminados.

Crecimiento y Eliminación de Brotes Adventicios en el Portainjerto

Luego de 6 semanas de haber incubado los microinjertos, se eliminaron los brotes adventicios del portainjerto, para evitar la inhibición del crecimiento de la púa microinjertada (Figura 5). En el caso de que la púa microinjertada, es deseable que genere brotes, estos no se remueven, se dejan continuar con su tiempo de crecimiento en los tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de microinjertos.

Figura 5

Eliminación de brotes adventicios en el portainjerto



Nota. A) microinjerto con brotes adventicios en el portainjerto; B) microinjerto sin brotes adventicios.

Variables Evaluadas

Se evaluó el porcentaje de meristemas establecidos vivos, el porcentaje de germinación del portainjerto y el porcentaje de pegue del microinjerto en dos semanas.

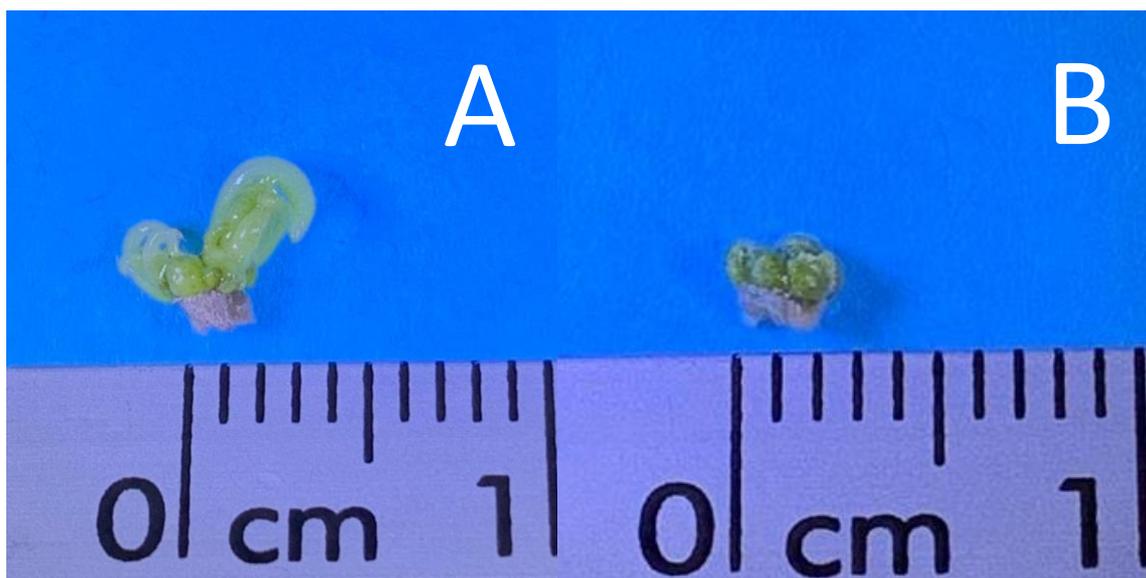
Resultados y Discusión

Establecimiento de Meristemas de Limón Persa *in vitro*

Se logró exitosamente el establecimiento *in vitro* de los meristemas en el medio de cultivo modificado publicado por Al-Khayri y Al-Bahrany (2021). Se establecieron en total 378 meristemas de un tamaño aproximado de 1-1.5 mm. En el periodo de tres semanas se observó el crecimiento de tejido callogénico y primordios foliares (Figura 6). El porcentaje de contaminados fue de 17.46% y el porcentaje de muerte fue de un 1.32%, dejándonos un 81.22% de meristemas establecidos *in vitro* vivos.

Figura 6

Meristemas incubados por 20 días



Nota. A) formación de primordios foliares; B) formación de tejido callogénico en la parte basal.

El cultivo de órganos indeterminados *in vitro* tiene una gran importancia en la propagación de plantas. Las dos técnicas de cultivo más populares son el cultivo de meristemas y el cultivo de brotes. Los cultivos de meristemas son principalmente utilizados en la producción de plantas libres de virus y los cultivos de brotes son más utilizados en la propagación masiva de plantas George (2008). En esta primera técnica de cultivo se extraen de los brotes apicales o axilares el domo meristemático (0.2-1.5

mm) removiendo la mayor cantidad de primordios foliares. El fundamento de esta práctica consiste en que existe una competencia entre la proliferación celular y la formación de partículas del virus en la región del meristema. Las células del meristema en división tienen una alta producción de auxinas y metabolitos que inhiben la replicación del virus. Además, el transporte del virus en la región meristemática es reprimida debido a la falta de un sistema vascular en este tejido (Taşkın et al. 2013).

Los porcentajes de multiplicación y regeneración de brotes se pueden mejorar con el uso de reguladores de crecimiento. Estudios realizados por Kaur (2016) en segmentos de epicótilo de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) demostraron que el uso de BAP (1 mg/L) en medio MS mejora la multiplicación de brotes en un 90.53% en un tiempo aproximado de 8 días y que el uso de ANA (1 mg/L) junto a AIB (0.5 mg/L) induce al rápido enraizamiento de estos en un 96% en un tiempo de 10 días. Además, este mismo estudio reportó que el uso de BAP (0.5 mg/L) y GA3 (1 mg/L) estimulan un rápido desarrollo y generación de brotes alargados.

Los dos factores que pueden afectar la sobrevivencia de los meristemas establecidos son: el tamaño de explante extraído, ya que a menor tamaño de tejido meristemático se obtiene un mayor porcentaje de plantas libres de virus pero un menor porcentaje de sobrevivencia y el no realizar transferencias periódicas a medios de cultivos frescos, por lo cual el tiempo recomendado para realizar la transferencia a medio fresco es cada 21 – 28 días (Al-Khayri y Al-Bahrany 2021).

Germinación del Portainjerto Carrizo citrange

Se sembraron un total de 104 semillas de *Carrizo citrange*. De las cuales 70 de estas se les removió la testa y se sembraron individualmente en tubos de ensayo y 34 que no se les removió la testa y fueron sembradas en parejas en frascos. El porcentaje de contaminados total fue de 2.9% y el porcentaje de muerte fue de 40.4%, dejándonos un 56.7% de semillas germinadas vivas.

Los resultados obtenidos demostraron que es mejor sembrar las semillas sin testa e individualmente en tubos de ensayo. Las semillas que fueron sembradas de esta forma germinaron a los 11 días de haber sido sembradas (Figura 7) y a las 3 semanas alcanzaron el tamaño adecuado (6-

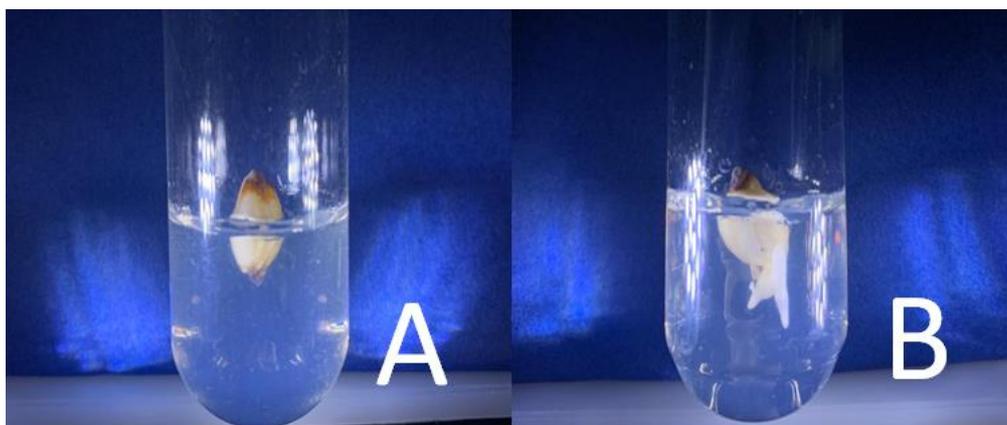
8 cm) para servir como portainjerto. Además, las semillas sembradas de esta forma obtuvieron un menor índice de muertes (15.4%) y germinaron raíces más gruesas y de mayor vigor.

Por el contrario las semillas que fueron sembradas en pareja y en frascos tuvieron las siguientes desventajas: mayor tiempo para germinar y alcanzar el tamaño adecuado para servir como portainjerto, mayor porcentaje de muerte (25%) debido a que la manipulación al momento de sembrarlas en los frascos dañaba el medio dejándolo acuoso, lo cual hacía que la mayoría de ellas se ahogaran y no lograran germinar. Además, las semillas sembradas de esta forma que lograron germinar fueron semillas más delgadas y de apariencia débil.

El éxito de la germinación de las semillas sin testa se podría explicar con los estudios realizados por Bewley y Black (1994) que demuestran que la absorción de agua de la semilla está directamente influenciada por la presencia de la testa y la permeabilidad de la misma. Por consiguiente afectando los procesos de imbibición y emergencia. Bajo condiciones naturales, las semillas con testas muy duras germinan solo hasta que esta se ablanda, por lo cual la remoción de la misma nos ayuda a evitar este paso y obtener una germinación mucho más rápida.

Figura 7

Semilla de Carrizo citrange



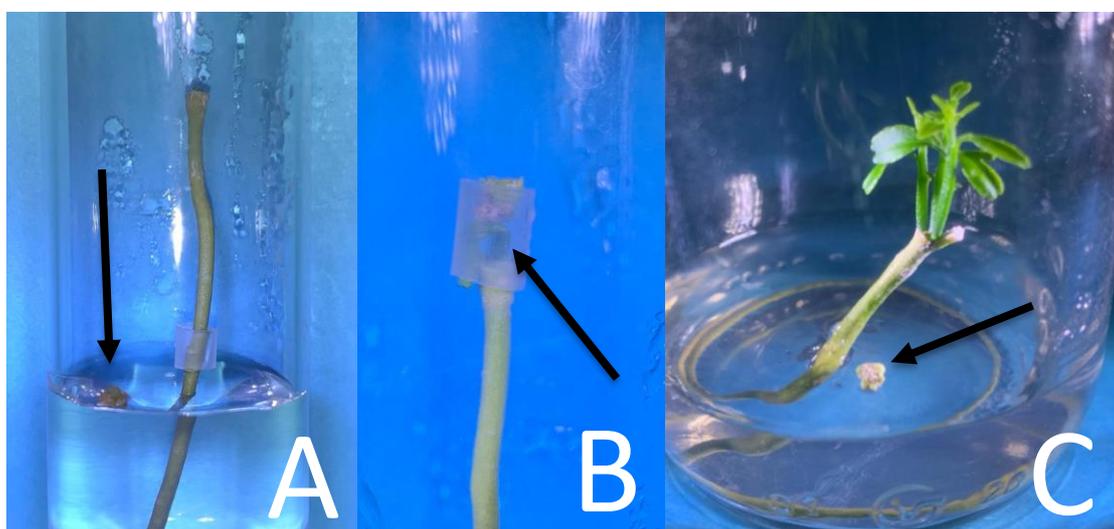
Nota. A) recién sembrada B) 11 días de incubación.

Microinjertos de Limón Persa y *Carrizo citrange*

No se logró la unión de los tejidos en el periodo de dos semanas. Esto pudo haber sido resultado de diferentes factores: falta de precisión en los cortes efectuados en la púa o en el portainjerto, falta de presión del catéter en el punto de unión injerto-patrón o el tiempo muy prolongado de incubación de los meristemas. En las Figuras 8 y 9 podemos evidenciar algunos de los efectos posiblemente ocasionados por los factores antes mencionados.

Figura 8

Efectos de la falta de presión en el punto de unión injerto-patrón



Nota. A) caída del meristema; B) portainjerto genera brotes adventicios fácilmente; C) No utilizar un material de soporte hace más propenso a que los tejidos se desprendan.

Figura 9

Desprendimiento de los meristemas por tiempo de incubación prolongado



Nota. Se utilizó meristemas con 5 semanas de incubación y portainjertos de 3 semanas de incubación.

Los puntos más críticos del microinjertado son: el momento que hacemos el corte basal del meristema, la decapitación del portainjerto y la unión de ambos. Ya que el grado de precisión en ambos cortes debe ser certero para no dañar ambos materiales y aumentar la posibilidad de pegue. El efectuar presión sobre el punto de unión injerto-patrón es esencial para que la púa y portainjerto logren la conexión entre los tejidos y así generen tejido calogénico y por ende exitosamente obtener un microinjerto. Si en algún punto se pierde el contacto entre la parte basal del meristema y la zona decapitada del portainjerto no se logrará formar la unión de ambos tejidos. El realizar injertos exitosos se requiere de mucha práctica y tiempo, por lo tanto, es un punto bastante importante que considerar al momento de analizar los resultados en este proyecto.

La púa puede ser microinjertada de forma directa al portainjerto o incubada por un periodo de tiempo corto antes de ser transferida. Según estudios realizados por George y Debergh (2008) en meristemas de durazno se comprobó que existe una mayor porcentaje de pegue y crecimiento cuando los meristemas son previamente incubados por un tiempo aproximado de dos semanas. Por otra parte, estudios realizados por Jonard *et al.* (1983) y Edriss y Burger (1984) muestran que los meristemas incubados previo a su microinjertación en medios conteniendo citoquininas (0.1 - 0.01

mg/L zeatina) y que fueron sumergidos durante 5-10 minutos en soluciones con benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 mg/L 2, 4-D o 1 mg/L BA) justo antes de ser transferidos dieron como resultado la rápida formación de brotes en la púa y un mayor porcentaje de microinjertos viables. La diferencias en cuanto al tiempo de incubación de los meristemas en los estudios realizados por George et al. (2008) y este estudio presente, junto a los resultados obtenidos con las prácticas realizadas en los estudios de Jonard *et al.* (1983) y Edriss y Burger (1984). Podrían explicar por qué los microinjertos realizados no tuvieron éxito.

Conviene, en este sentido acudir a estudios realizados por (Mosella-Chancel y Ascui M. 1991) donde se expresa que el porcentaje de prendimiento e inicio del desarrollo de los microinjertos puede mejorarse en ambas especies (púa y portainjerto) si se estudian variables como la edad los tejidos vegetales, el uso de biorreguladores en la zona de injerto (punto de unión injerto-patrón), diferentes métodos de injerto aplicado y el portainjerto utilizado.

El éxito del microinjerto depende en un gran porcentaje de la selección del material para púa y para portainjerto. El grado de compatibilidad entre ambos tiene grandes efectos sobre el vigor, crecimiento y desarrollo de este. Sin embargo, la realización de esta práctica no es fácil de llevar a cabo. Pueden ocurrir muchos errores en el proceso que causan daños físicos en el microinjerto o contaminaciones en el mismo, lo cual puede reducir el porcentaje de éxito en esta práctica.

Conclusiones

El establecimiento *in vitro* de los meristemas de limón persa se logró exitosamente.

La germinación *in vitro* de las semillas de *Carrizo citrange* se logró exitosamente.

El pegue del microinjerto de limón persa en el portainjerto *Carrizo citrange* no se logró.

Recomendaciones

Microinjetar material de púa incubado lo más fresco posible. No sobrepasar el tiempo de dos semanas de incubación de la púa.

Realizar pruebas con tubos de infusión con un radio menor a 3 mm o utilizar materiales como clips de silicona (silicone chips/clips) para asegurar la presión y contacto necesario en el punto de unión injerto-patrón.

Realizar pruebas haciendo uso de la forma de microinjertación directa al portainjerto.

Realizar pruebas utilizando los protocolos de preparación de meristemas de Jonard *et al.* (1983) y de Edriss y Burger (1984) previo a la transferencia de estos al portainjerto.

Realizar pruebas haciendo uso de las concentraciones de reguladores de crecimiento estudiadas por Kaur (2016) en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de meristemas.

Realizar las transferencias de los meristemas a medio de cultivo fresco cada 21 -28 días como recomienda Al-Khayri y Al-Bahrany (2021).

Referencias

- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. 2021. In vitro micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). [sin lugar]. Informe no. 9; [consultado el 7 de nov. de 2021]. <https://www.jstor.org/stable/24106444?seq=1>.
- Bewley JD, Black M. 1994. Seeds: physiology of development. 2ª ed. New York, NY: Plenum Press. 445 p. (The language of science). ISBN: 0306447479. eng.
- Castle WS, Tucker DPH, Krezdorn AH, Youtsey CO. 1993. Rootstocks for Florida Citrus Rootstock Selection The first step to success. 2ª ed. Lake Alfred, Florida: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences; [consultado el 25 de may. de 2022]. https://crec.ifas.ufl.edu/extension/citrus_rootstock/Rootstock-Literature/Rootstocks%20for%20Florida%20Citrus.pdf.
- Edriss MH, Burger DW. 1984. Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. [sin lugar]. Informe no. 3; [consultado el 16 de jun. de 2022].
- FAO. 2021. Citrus Fruit Fresh and Processed Statistical Bulletin 2020. Roma, Italia: [sin editorial]. 48 p. ; [consultado el 7 de nov. de 2021]. <https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>.
- George EF. 2008. Types of tissue culture. En: George EF, Hall MA, Klerk G-J de, editores. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Vol. 1. 3ª ed. Dordrecht, Países Bajos: George, Edwin F; Hall, Michael A; Klerk, Geert-Jan de. p. 8–9 ; [consultado el 16 de jun. de 2022].
- George EF, Debergh PC. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. En: George EF, Hall MA, Klerk G-J de, editores. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Vol. 2. 3ª ed. Dordrecht, Países Bajos: George, Edwin F; Hall, Michael A; Klerk, Geert-Jan de. p. 55–58 ; [consultado el 16 de jun. de 2022].
- George EF, Hall MA, Klerk G-J de, editores. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. 3ª ed. Dordrecht, Países Bajos: George, Edwin F; Hall, Michael A; Klerk, Geert-Jan de. ISBN: 978-1-4020-5005-3; [consultado el 16 de jun. de 2022].
- Jonard R, Hugard J, Macheix J-J, Martinez J, Mosella-Chancel L, Poessel JL, Villemur P. 1983. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. [sin lugar]. Informe no. 2.
- Kaur S. 2016. *In vitro* plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) through epicotyl segments by direct shoot organogenesis. Punjab, India: Punjab Agricultural University. Informe no. 2; [consultado el 16 de jun. de 2022]. <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/865>.
- Mendez M, Caamal J, Rodriguez N, Vargas A, Alamilla J, Criollo M. 2020. Avances y limitantes en la micropropagación del limón persa (*Citrus x latifolia* Tan.). Temas de ciencia y tecnología; [consultado el 16 de jun. de 2021]. 24(72):33–40. [https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas72/5_Avances%20y%20limitantes%20en%20la%20micropropagaci%3b3n%20del%20lim%3b3n%20persa%20\(citrus%20x%20latifolia%20Tan.\).pdf](https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas72/5_Avances%20y%20limitantes%20en%20la%20micropropagaci%3b3n%20del%20lim%3b3n%20persa%20(citrus%20x%20latifolia%20Tan.).pdf).
- Mosella-Chancel L, Ascui M. L. 1991. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. En: Roca W, Mroginski L, editores. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Vol. 23. Colombia: [sin editorial]. p. 513–532 ; [consultado el 2 de jun. de 2022].

- Navarro L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. [sin lugar]: ISHS. Informe no. 227; [consultado 16/06/22]. https://www.actahort.org/books/227/227_2.htm.
- Ojeda Ayala JA. 2020. Protocolo para establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) a partir de meristemas: Revisión de literatura [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 25 p; [consultado el 7 de nov. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6800/1/CPA-2020-T081.pdf>.
- Skewes M. 2017. Citrus Rootstock Technical Guide – Mature Tree Assessments. Loxton, Australia: South Australian Research & Development Institute PIRSA; [actualizado 2017; consultado el 25 de may. de 2022]. https://pir.sa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0010/296902/Citrus_Technical_Guide.pdf.
- Taşkın H, Baktemur G, Kurul M, Büyükalaca S. 2013. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. Turquía: University of Nigde, University of Osmaniye Korkut Ata, University of Cukurova. eng; [consultado el 16 de jun. de 2022].
- Volk G, Bonnard R. 2019. NLGRP Citrus Cryopreservation & Micrografting Media/Solution Formulations: In vitro culture media. Fort Collins, Colorado: Colorado State University; [consultado el 7 de nov. de 2021]. 4 p. <https://colostate.pressbooks.pub/app/uploads/sites/7/2019/04/NLGRP-Citrus-Cryo-Media-2019.pdf>.
- Volk G, Bonnard R, Shepherd A. 2020. Citrus Micrografting for Regrowth After Shoot Tip Cryopreservation. Fort Collins, Colorado: Colorado State University; [consultado el 7 de nov. de 2021]. Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules. en. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/citrus-micrografting/>.
- Volk G, Krueger R, Moreland B, Bonnard R, Shepherd A. 2020. Citrus Shoot Tip Cryopreservation – Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules. Fort Collins, Colorado: Colorado State University; [consultado el 7 de nov. de 2021]. Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/citrus-cryopreservation/>.

Anexos

Anexo A

Protocolo de microinjertación de limón persa en el portainjerto Carrizo citrange

Error! Bookmark not defined.

Raúl Alejandro Barahona Reyes

Materiales

- 1) Meristemas de limón persa establecidos *in vitro* por 1 o 2 semanas y semillas de *Carrizo citrange* sembradas *in vitro* por 3 o 4 semanas.
- 2) Cloro líquido comercial (4.72% de NaClO), Tween[®]80, agua potable, agua destilada y agua destilada estéril.
- 3) Medio de cultivo MS modificado para el establecimiento *in vitro* de microinjertos de limón persa en patrones de *Carrizo citrange* publicado por Volk y Bonnart et al. (2020).
- 4) Bisturís del número 11 y 25, pinzas de acero, tijeras quirúrgicas, probeta, vasos de precipitación (beaker), tubo de infusión de poliuretano, liga de caucho, gaza estéril, tubos de ensayo, platos Petri estéril, cinta de plástico, cinta adhesiva, marcador permanente.

Procedimiento de microinjertación

Preparación y desinfección de tubos de infusión

- 1) Cortar el tubo de infusión en secciones de 1cm de longitud.
- 2) Hacer un corte longitudinal en el tubo cortado con la finalidad de facilitar su remoción cuando se haya dado la unión de los tejidos.
- 3) En un beaker sumergir los tubos de infusión cortados en una solución de agua y Tween[®]80 (1 gota por 100 mL de agua) durante 10 minutos. A continuación, realizar tres enjuagues con agua potable y sumergir en isopropanol al 70% durante 2 minutos, más otros tres enjuagues

con agua potable. Finalmente, sumergir en una solución de 10% cloro comercial y una gota de Tween®80 durante 10 minutos.

- 4) Tapar el beaker con una gaza estéril fijándola con una liga de caucho.
- 5) Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Selección y preparación del portainjerto.

- 1) Seleccionar una raíz gruesa y vigorosa de 6-8 cm de largo.
- 2) Extraer la raíz del tubo de ensayo y colocarla en un plato Petri estéril.
- 3) Realizar un corte de 1cm para separar la parte radicular de la parte aérea.

Selección y preparación de los meristemas establecidos *in vitro*

- 1) Seleccionar meristemas de un aspecto vigoroso y color verde intenso.
- 2) Extraer los meristemas del tubo de ensayo y colocarlo en el plato Petri estéril junto a la raíz anteriormente extraída.
- 3) Realizar un corte de aproximadamente 0.2 mm en la parte basal del meristema extraído.

Establecimiento del microinjerto

- 1) Insertar la raíz en un extremo del tubo de infusión y seguidamente colocar en el otro extremo el meristema.
- 2) Asegurarse que ambos tejidos estén en contacto y que el tubo de infusión genere la presión suficiente para fijar el punto de unión injerto-patrón.
- 3) Con las pinzas de acero tomar el microinjerto y colocarlo en el tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo.

- 4) Cerrar el tubo de ensayo con la tapadera de este y sellarlo con cinta plástica, seguidamente rotular la fecha en que se realizó con cinta adhesiva y un marcador.
- 5) Incubar los microinjertos bajo condiciones de 21 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y una radiación fotosintéticamente activa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Eliminación de brotes adventicios en el portainjerto

- 1) Extraer el microinjerto del tubo de ensayo y colocarlo en un plato Petri estéril.
- 2) Podar cuidadosamente los brotes adventicios del portainjerto sin dañar la púa microinjertada.
- 3) Colocar el microinjerto podado en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo fresco.
- 4) Cerrar el tubo de ensayo con la tapadera de este y sellarlo con cinta plástica, seguidamente rotular la fecha en que se realizó con cinta adhesiva y un marcador.
- 5) Continuar la incubación bajo condiciones de 21 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y una radiación fotosintéticamente activa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Bibliografía

Volk, G. y Bonnard, R. (2019). NLGRP Citrus Cryopreservation & Micrografting Media/Solution Formulations: In vitro culture media. Colorado State University. <https://colostate.pressbooks.pub/app/uploads/sites/7/2019/04/NLGRP-Citrus-Cryo-Media-2019.pdf>

Barahona, R. (2022). Evaluación del establecimiento in vitro de meristemas de limón persa (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) y del protocolo de microinjertación del mismo cultivo en el portainjerto *Carrizo citrange*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 36 p.