

**Protocolo para establecimiento *in vitro* de lima
ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) a
partir de meristemas: Revisión de literatura**

Juan Alfonso Ojeda Ayala

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Protocolo para establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) a partir de meristemas: Revisión de literatura

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

Presentado por

Juan Alfonso Ojeda Ayala

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Protocolo para establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) a partir de meristemas: **Revisión de literatura**

Presentado por:

Juan Alfonso Ojeda Ayala

Aprobado por:



María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Cinthya Martínez (Nov 11, 2020 20:04 CST)

Cinthya Martínez, Mtr.
Asesora



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano
Académico

Protocolo para establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) a partir de meristemas: Revisión de literatura

Juan Alfonso Ojeda Ayala

Resumen. El cultivo de meristemas es una de las técnicas utilizadas para la propagación de cítricos con el objetivo de obtener plantas libres de enfermedades. El objetivo de este estudio fue documentar el protocolo de establecimiento *in vitro* de meristemas de lima ácida y respaldarlo mediante una revisión de literatura. Los meristemas se establecieron en el medio de Murashige y Skoog suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP). La citoquinina BAP es indispensable para fase de establecimiento debido a la inducción en el crecimiento de brotes y los niveles óptimos son de 1-2 mg/L. Añadir auxinas como ácido naftaleneacético (ANA) y ácido giberélico (AG) incrementan el número de brotes por explante. En fase de enraizamiento niveles de 0.5 mg/L de ANA promueven el mayor número de raíces. Auxinas como ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (AIB) disminuye número de raíces por explante. Se recomienda el uso de domos meristemáticos como explantes ya que disminuye la multiplicación de virus, esto se debe a que los virus se mueven a través de los haces vasculares que en los meristemas están ausentes o en baja cantidad, tienen alta actividad de metabolitos durante la división celular que no permiten la replicación del virus y alto nivel endógeno de auxinas que podrían inhibir la multiplicación de estos patógenos. Se logró establecer *in vitro* meristemas de lima ácida y documentar el protocolo. Se recomienda establecer experimentos para determinar los reguladores de crecimiento específicos para cada etapa de la micropropagación.

Palabras clave: Domos meristemáticos, regeneración, reguladores de crecimiento.

Abstract. Meristem culture is one of the techniques used for the propagation of *Citrus* in order to obtain disease-free plants. The aim of this study was to document the *in vitro* establishment protocol for acid lime meristems and to support it through a literature review. Meristems were established in Murashige and Skoog medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP). Cytokinin BAP is essential for the establishment phase due to the induction of shoot growth and optimal levels are 1-2 mg / L. Adding auxins such as naphthaleneacetic acid (NAA) and gibberellic acid (GA) increase the number of shoots per explant. In the rooting phase, levels of 0.5 mg / L of NAA promote the greatest number of roots. Auxins such as indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) promote fewer roots per explant. Auxins such as indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) decrease the number of roots per explant. The use of meristematic domes as explants is recommended since it decreases the multiplication of viruses, this is because the viruses move through the vascular bundles that are absent or in low quantity in the meristems, they have high metabolite activity during the cell division that do not allow the replication of the virus and a high endogenous level of auxins that could inhibit the multiplication of these pathogens.. It was possible to establish *in vitro* acid lime meristems and document the protocol. Experiments are recommended to determine specific growth regulators for each stage of micropropagation.

Key words: Growth regulators, meristematic domes, regeneration.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen.....	iii
Índice General	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	11
5. RECOMENDACIONES	12
6. LITERATURA CITADA	13
7. ANEXOS.....	16

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de lima ácida (<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle)	6
2. Efecto de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación	9
Figuras	Página
1. Lima ácida “ <i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle”	3
2. Preparación de explantes de <i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle para desinfección.....	4
3. Extracción de brotes axilares de lima ácida “ <i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle”	5
Anexos	Página
1. Protocolo de establecimiento de <i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle a partir de meristemas.....	16

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de los cítricos es explotado a nivel mundial en zonas tropicales y subtropicales, ya que son conocidos por su gran adaptación hacia estas condiciones favorables para su crecimiento y desarrollo óptimo. La producción de cítricos está muy extendida en todo el mundo, ubicada aproximadamente entre las latitudes 40°N y 40°S, con más de 140 países productores (Badenes y Byrne 2012). Entre los países con mayor producción se encuentran India, México, China Continental, Argentina y Brasil con volúmenes de producción que superan las 1,400 toneladas por cada país (Statista 2020). No hay certeza del lugar exacto de origen, pero se cree que es la China meridional en donde se cultivó por siglos (Rodríguez 2012).

Existen condiciones que pueden bajar los rendimientos de este cultivo, como mal diseño de drenajes, podas inadecuadas, poca sanidad con los materiales utilizados, cambios de temperatura y humedad, entre otras. Estas condiciones provocan la incidencia de plagas y enfermedades que pueden ser transmitidas entre plantas y a las semillas que serán utilizadas para nuevos lotes de producción. Cuando hay excesos de humedad incrementan ataques de picudo de los cítricos y se intensifica la presencia de antracnosis, gomosis y otras enfermedades de tipo bacterial o viral (ICA 2012).

Los cítricos, en especial ciertas variedades de limones son atacados por microorganismos como virus y bacterias que reducen la producción (Sáenz *et al.* 2019). Éstos son patógenos capaces de causar muerte progresiva en los cultivos que infectan y son de gran importancia económica por ello. Una enfermedad de gran importancia económica en los cítricos es el Huanglongbing (HLB), que es causada por la bacteria *Candidatus liberibacter* que es transmitida por el psílido *Diaphorina citri*. Esta enfermedad es difícil de controlar ya que el microorganismo se encuentra en los haces vasculares, por lo tanto, la propagación convencional por injerto o semilla dan resultado plantas infectadas.

La propagación convencional de cítricos para obtención de patrones para injerto usando semillas demanda tiempo y presenta problemas de polinización cruzada y poliembriónia, esto repercute en las características de resistencia que se vuelven muy variables en los patrones y a su vez presenta problemas sanitarios (Arias 2013). Una vez que las plantas se infectan con patógenos vasculares, la planta vive con éstos durante toda su etapa productiva. El difícil control de patógenos vasculares y su gran impacto en las plantaciones exigen nuevos métodos de obtención de material vegetal libre para mantener niveles buenos de producción con frutos de calidad. Algunas de las opciones para sanear las plantas son el cultivo *in vitro* de meristemas tratados además con termoterapia o quimioterapia. El cultivo de tejidos es una técnica que permite el crecimiento y desarrollo de células o tejidos en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas (Daorden 2012).

Con la ayuda de esta técnica se ahorra tiempo, espacio y dinero que se dan en el tratamiento de enfermedades en plantaciones infectadas que disminuyen los rendimientos, debido a que nos aseguramos de que el material vegetal utilizado para propagar se encuentre libre de patógenos. Por esta razón, es de gran importancia dar seguimiento a tecnologías como el cultivo de meristemas, que puede llegar a ser una alternativa para la producción de material sano.

Las técnicas de micropropagación y producción de plantas libres de enfermedades se han perfeccionado hasta el punto que se han convertido en prácticas estándares para una variedad de cultivos (Srivastava *et al.* 2005).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Documentar el protocolo de establecimiento *in vitro* de meristemas de lima ácida para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Respalda el protocolo mediante revisión de literatura.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión de literatura

El estudio consistió en la revisión de literatura sobre establecimiento de meristemas y sus beneficios como método de saneamiento de material vegetal infectado. La información se obtuvo mediante las bases de datos Springer y Google Scholar, con 27 investigaciones entre 1987 hasta 2020, las cuales apoyaron el desarrollo del establecimiento del protocolo con las características necesarias para cada etapa.

Protocolo de establecimiento

El protocolo usado para este estudio fue el publicado por Volk *et al.* (2019) el cual tenía las características óptimas del material vegetal a seleccionar y el procedimiento paso a paso sobre como extraer correctamente el meristema axilar.

Fuente de explante. El establecimiento de los explantes se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. Las varetas de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) variedad Tahití se seleccionaron de la plantación establecida en el lote 0 ubicado en Zona 2, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, San Antonio de Oriente, Francisco Morazán Honduras (Figura 1).



Figura 1. Lima ácida *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle. A) planta madre, B) rama seleccionada.

Recolección y preparación del material vegetal. Se seleccionaron varetas de color verde claro, con meristemas axilares sin brotar, de tamaño de 10 - 15 cm. El brote vegetativo óptimo para extraer meristemas tiene unos 3 - 5 mm de diámetro (Volk *et al.* 2019). Se removió hojas y espinas,

luego se hizo lavado superficial con agua y jabón de las varetas y posteriormente se separaron en secciones de 2 - 4 cm con 2 - 3 meristemos axilares (Figura 2).

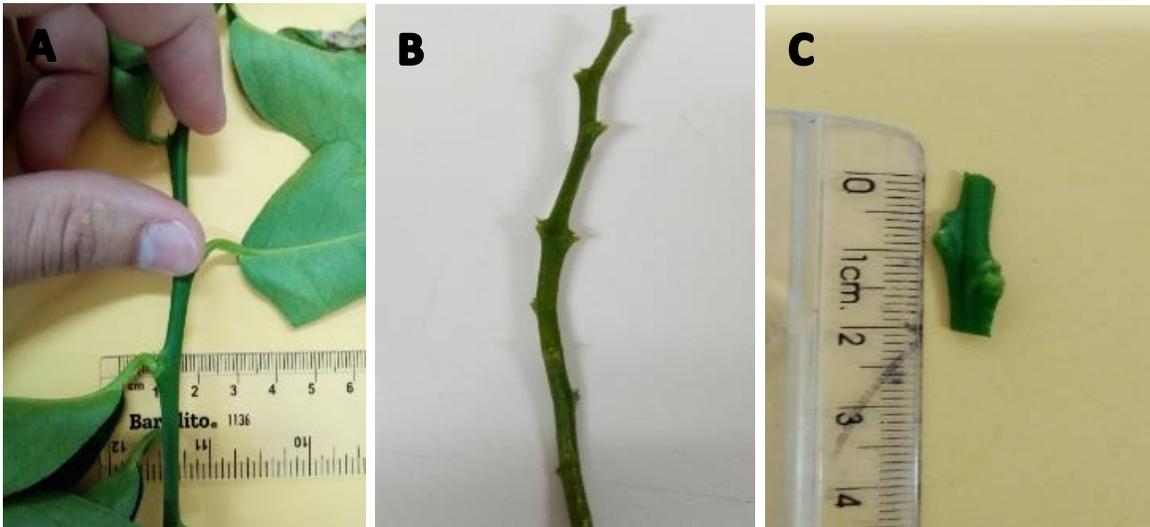


Figura 2. Preparación de explantes de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle para desinfección. A) medición de diámetro de ramas, B) rama sin hojas y espinas, C) verificación de tamaño óptimo.

Desinfección de explantes. Los explantes se sumergieron en etanol al 70% por 20 segundos. Luego, en una solución de NaClO al 15% (volumen/volumen) (hipoclorito de sodio al 4.5% de ingrediente activo) adicionando dos gotas de Tween 80[®] por cada 100 mL de solución, por 15 minutos. Por último, se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar (Vidal Rivera 2014).

Extracción de brote axilares y siembra. En la cámara de flujo laminar se utilizaron herramientas esterilizadas a 250 °C en esterilizador de calor seco. Se realizó cuatro incisiones a los costados de los brotes axilares, para eliminar las escamas que cubren el meristema y a continuación se extrajo el meristema (Figura 3). Posterior a esto se sembró en tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo estéril, se selló y etiquetó. Cada tres días se revisaron los explantes para aislar cultivos muertos o contaminados, y monitorear crecimiento y desarrollo.

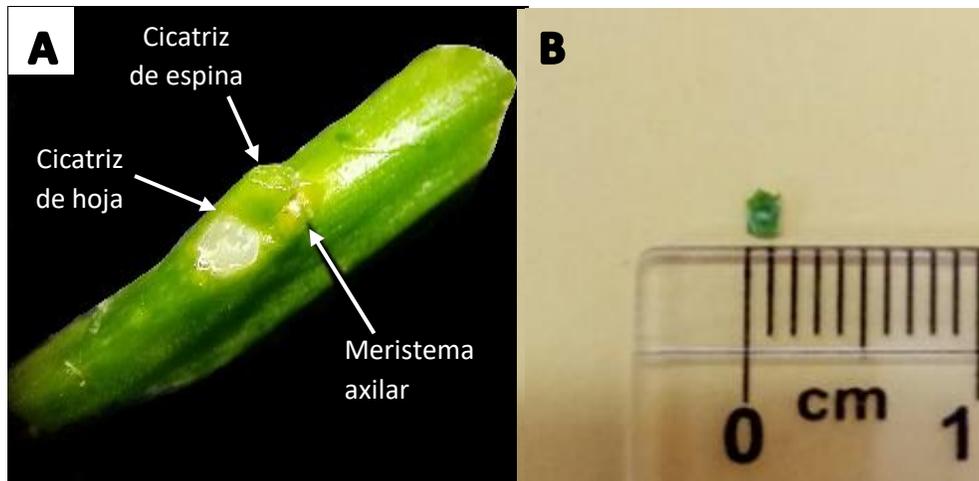


Figura 3. Extracción de meristemas axilares de lima acida *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle. A) vista desde el estereomicroscopio (lente 10×) de explante, B) tamaño óptimo de meristema axilar para siembra en medio MS.

Medio de cultivo. Los meristemas axilares se establecieron en el medio de cultivo modificado por Al-Khayri y Al-Bahrany (2001) (Cuadro 1). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 usando KOH 1M y se gelifico con 1.8 g/L de Phytigel. El medio de cultivo se esterilizó a 121 °C, a 1 kg/cm² por 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle).

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	400.000
	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 magnesio tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdeno de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetracético	50.000
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	1.000
		Piridoxina	1.000
		Ácido nicotínico	1.000
		Glicina	2.000
		Pantotenato de Ca	5.000
		BA o BAP	1.000
	Sacarosa	30,000.000	

Fuente: Al-Khayri y Al-Bahrany (2001).

Incubación

Los explantes se incubaron con condiciones controladas 25 °C, 70% de humedad relativa, luz durante 16 horas y oscuridad 8 horas, 40 μmol/m²/s (radiación fotosintéticamente activa).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de meristemas

El cultivo de meristemas es una técnica para producir plantas libres de virus, ha sido utilizado extensamente para la propagación rápida de un gran número de especies vegetales (Sharmin *et al.* 2008). El uso de domos meristemáticos como fuente de propagación tiene su fundamento en que los virus se mueven a través de los haces vasculares que en los meristemas están ausentes y tienen alta actividad de metabolitos en las células meristemáticas en división que no permiten la replicación del virus y alto nivel endógeno de auxinas que podrían inhibir la multiplicación de estos patógenos (Sarker *et al.* 2015).

Los meristemas axilares se establecieron con éxito en el medio de cultivo modificado por Al-Khayri y Al-Bahrany (2001). El tamaño óptimo del meristema debe ser 1-1.5 mm (Volk *et al.* 2019). Sarker *et al.* (2015) utilizaron tamaños de 0.2-0.3 mm de meristemas de lima ácida y obtuvieron 80% de respuesta en los explantes aplicando 1.5 mg/L BAP. A menor tamaño de tejido meristemático, el porcentaje de plantas libres de virus es mayor pero menor la sobrevivencia de estos (Martínez 1987).

La contaminación fue de 6% en la etapa de establecimiento. Se observó a los 15 días callogénesis, crecimiento de brotes en la mayoría, en otros, crecimiento de hojas. La formación de callos está directamente relacionada con los niveles de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y concentraciones endógenas pueden variar dependiendo de la especie y de la fuente de explante (Iqbal *et al.* 2019).

En la micropropagación de lima ácida existen protocolos que se usan para sanear el material vegetal como la termoterapia y fitoterapia. En mandarina Kinnow mediante termoterapia se ha logrado porcentajes de eliminación de virus de 59% aumentando de 30 a 38 °C en nueve días y 41% de eliminación de virus a 50 °C durante 120 minutos (Sharma *et al.* 2007; NAPPO 2015).

Medios de cultivo y reguladores de crecimiento

Los requerimientos de reguladores de crecimiento exógenos varían dependiendo de los niveles endógenos de citoquininas y auxinas del explante (Kour y Singh 2012). Conociendo la producción del tipo y la cantidad de la hormona se puede calcular con mayor precisión el requerimiento necesario para el cultivo.

Las citoquininas inducen la formación de brotes e inhiben la formación de raíces (Kaur 2016). Niveles muy altos de BAP tienen efectos inhibidores en la elongación de brotes y tamaño de hojas (Al Khayri y Al Bahrany 2001). El uso de auxinas junto con altos niveles de citoquininas regula el efecto inhibitorio que estas presentan sobre los brotes (Singh *et al.* 2018). Sarker *et al.* (2015) en su estudio obtuvo que la mejor combinación para establecimiento de brotes fue de 1 mg/L BAP + 0.5 GA₃ + 0.5 mg/L NAA con 10 brotes por explante. Otro estudio en lima ácida mediante segmentos nodales obtuvo nueve brotes con niveles de 2 mg/L BAP + 1 mg/L KIN + 1 mg/L NAA (Al-Bahrany 2002).

Para el establecimiento de pomelo (*C. grandis* L. Osbeck) usando cultivo de domos meristemáticos se obtuvo 5.2 brotes por explante con 0.2 mg/L BAP (Paudyal y Haq 2000). El medio de cultivo suplementado con 2.9 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA fue la mejor combinación para fase de multiplicación, con 3.25 brotes por explante usando segmentos nodales de mandarina Kinnow (*C. nobilis* × *C. deliciosa*) (Singh *et al.* 2018). Se demostró que niveles de 1 mg/L BAP genera mayor número de brotes (12.5) en limón rugoso (*C. jambhiri* Lush.) mediante segmentos de epicótilo (Kaur 2016). Kour y Singh (2012) en su estudio con limón rugoso mediante segmentos nodales obtuvieron 5.34 brotes en los medios con 1.5 mg/L BAP + 500 mg/L extracto de malta (EM). En otro estudio de limón rugoso con segmento de epicótilo se obtuvo que 2 mg/L BA + 500 mg/L EM + 25,000 mg/L Sacarosa extra aumenta considerablemente el número de brotes (9.6) (Rattanpal *et al.* 2011).

Combinaciones de benciladenina (BA) con ácido giberélico (AG) a niveles entre 2-3 mg/L BA + 1-2 mg/L GA mejoran la multiplicación de brotes por explante (2.3) en Alemow (*C. macrophylla*) y mandarina Cleopatra (*C. reshni*) (Tallón *et al.* 2012). Además, en fase de elongación de brotes en limón rugoso se reportan que combinaciones de 0.5 mg/L BAP + 1 mg/L GA₃ generan el mayor número de brotes alargados (8.5) (Kaur 2016).

Al-Khayri y Al-Bahrany (2001) en su estudio en lima ácida realizaron refrescamiento de medios de cultivos para cada fase crecimiento cada 28 días. Realizar los refrescamientos más tarde puede ocasionar el pobre crecimiento y desarrollo de los brotes. En el Cuadro 2 se presenta un resumen de la búsqueda bibliográfica realizada y los resultados obtenidos por los investigadores.

Cuadro 2. Efecto de reguladores de crecimiento en la etapa de multiplicación de cítricos.

Regulador de crecimiento mg/L	Brotes/explante	Nombre común	Nombre científico	Explante	Referencia
1.5 BAP + 0.5 GA ₃ + 0.5 NAA	10.00	Lima ácida	<i>C. aurantiifolia</i>	Meristema	Sarker <i>et al.</i> 2015
2 BAP + 1 KIN + 1 NAA	9.00	Lima ácida	<i>C. aurantiifolia</i>	Nodal	Al-Bahrany 2002
1 BAP + 0.5 KIN	8.00	Lima ácida	<i>C. aurantiifolia</i>	Nodal	Al-Khayri y Al-Bahrany 2001
1 BAP	12.50	Limón rugoso	<i>C. jambhiri</i> Lush.	Epicotilo	Kaur 2016
2 BAP + 500 EM + 25,000 Sacarosa	9.60	Limón rugoso	<i>C. jambhiri</i> Lush.	Epicotilo	Rattanpal <i>et al.</i> 2011
1.5 BAP + 500 EM	5.34	Limón rugoso	<i>C. jambhiri</i> Lush.	Nodal	Kour y Singh 2012
0.2 BA	5.20	Pomelo	<i>C. grandis</i> L. Osbeck	Meristema	Paudyal y Haq 2000
1 BAP	4.56	Naranja Valencia	<i>C. volkameriana</i>	Hipocotilo	Tavano <i>et al.</i> 2009
0.5 BAP	3.70	Naranja agria	<i>C. aurantium</i>	Hipocotilo	Tavano <i>et al.</i> 2009
2.9 BAP + 0.06 NAA	3.25	Mandarina Kinnow	<i>C. nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>	Nodal	Singh <i>et al.</i> 2018
3 BA + 2 GA	2.30	Alemow	<i>C. macrophylla</i>	Nodal	Tallón <i>et al.</i> 2012
2 BA + 1 GA	2.30	Mandarina Cleopatra	<i>C. reshni</i>	Nodal	Tallón <i>et al.</i> 2012

Etapa de enraizamiento

Para estimular el crecimiento de raíces en los meristemas se debe transferir a medios de cultivo que contengan auxinas como ANA, AIB o AIA (Carimi 2003). En un estudio de Al-Khayri y Al-Bahrany (2001) en lima ácida el ácido indolacético (AIA) induce enraizamiento de brotes, hasta 56 % con 1 mg/L AIA y niveles de 0.5 mg/L AIA obtienen 5.2 raíces. También reportan que niveles mayores a 1 mg/L de AIA disminuye el número de raíces. Otro estudio en lima ácida demuestra que 2 mg/L ANA + 2 mg/L AIB obtienen nueve raíces por explante (Al-Bahrany 2002). Sarker *et al.* (2015) en la etapa de enraizamiento de lima ácida obtuvo 10 raíces con medio suplementado a 0.5 mg/L de ANA (Sarker *et al.* 2015).

En limón rugoso se obtuvo cinco raíces en 14 días con combinaciones de 0.1 mg/L AIB + 0.5 mg/L AIA y combinaciones de 0.5 mg/L AIB + 1 mg/L NAA mostraron capacidad de respuesta temprana

en crecimiento radicular (10 días) pero pobre número (1.52) de raíces (Kaur 2016). En un estudio en pomelo con domos meristemáticos se concluyó que ANA estimula mayor crecimiento en raíces ya que se obtuvo cuatro raíces por explante suplementando con 1.21 mg/L ANA en comparación a una raíz con 1.21 mg/L AIB (Paudyal y Haq 2000).

También se reporta que la muerte de explantes durante la etapa de establecimiento puede ser causada también por la falta de transferencia a medios de cultivo frescos suplementados con reguladores de crecimiento específicos para cada fase (Al-Khayri y Al-Bahrany 2001). Por esto se recomienda hacer los refrescamientos cada 21- 28 días.

4. CONCLUSIONES

- Se documentó el protocolo de establecimiento *in vitro* de meristemas de lima ácida para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Se respaldó el protocolo mediante revisión de literatura.
- El cultivo de meristemas posee características idóneas para producir material vegetal libre de virus.
- El uso de la combinación de BAP con AG y ANA induce un mayor número de brotes en la etapa de multiplicación de lima ácida.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones para evaluar el efecto de la termoterapia para la eliminación de patógenos.
- Evaluar la sanidad de los meristemas establecidos para conocer la presencia o no de patógenos.
- Continuar con el protocolo para llevar los explantes a etapas de multiplicación y enraizamiento.

6. LITERATURA CITADA

- Al-Bahrany AM. 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Sci Horti*. 95(4):285-295. [consultado el 25 de ago. de 2020]. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00349-1).
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Curr Sci*. 81(9):1242-1246.
- Arias Cordero RS. 2013. Efecto enraizante del humus de lombriz en propagación por estacas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*), Citrumelo (*Citrange citrumelo*), y lima Rangpur (*Citrus limonia*) para la obtención de árboles madre en el municipio de Coroico. [Tesis de pregrado]. Bolivia: Universidad Mayor de San Andres. 69p.
- Badenes ML, Byrne DH. 2012. Fruit breeding. New York, USA: Springer; [consultado el 15 de jun. de 2020]. <https://www.springer.com/gp/book/9781441907622>.
- Carimi F, De Pasquale F. 2003. Micropropagation of citrus. *Micropro Woody Trees & Fruits*. 589-619. DOI: 10.1007/978-94-010-0125-0_20.
- Daorden, ME. 2012. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Argentina:INTA; [consultado el 21 de may. de 2020]. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-md_0701.pdf.
- [ICA] Instituto Colombiano Agropecuario. 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos: Medidas para la temporada invernal. Colombia:Produmedios; [consultado el 21 de may. de 2020]. <https://www.ica.gov.co/getattachment/18307859-8953-4a7d-8d7f-864e3f4898cf/Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-citricos.aspx>.
- Iqbal M, Wali VK, Bakshi P, Kour K, Razdan VK, Sinha B, Sood KK. 2019. *In vitro* Propagation of *Citrus* Species through Callus Induction and Regeneration: A Review. *Int J Cur Microbiol App Sci*. 8(10):2282-2295. DOI: 10.20546/ijemas.2019.810.265.
- Kaur S. 2016. *In vitro* plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) through epicotyl segments by direct shoot organogenesis. *J Appl & Nat Sci*. 8 (2):724-729.
- Kour K, Singh B. 2012. *In vitro* multiplication of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). *IOSR-JAVS*. 1(4):06-09. DOI: 10.9790/2380-0140509.
- Martínez P. 1987. Obtención de plantas libres de patógenos mediante el cultivo de tejidos meristemáticos y termoterapia. Colombia:ICA. 22:230-249. [consultado el 26 de sep. de 2020]. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/30335>.
- [NAPPO] North American Plant Protection Organization. 2015. Protocolo de tratamientos de la NAPPO. USA:NAPPO; [consultado el 22 de may. de 2020] https://www.nappo.org/files/2314/4043/0765/TP_01-Thermotherapy_Citrus_-22-05-2015-s.pdf.
- Paudyal K, Haq N. 2000. *In vitro* propagation of pumello (*Citrus grandis* L. Osbeck). UK:*In Vitro Cell.Dev.Biol-Plant*. [consultado el 28 de jul. de 2020]. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0091-6>.

- Rattanpal HS, Kaur G, Gupta M. 2011. In vitro plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) by direct organogenesis. *Afric J of Biotec.* 10(63):13724-13728. DOI: 10.5897/AJB09.1264.
- Rodríguez DS. 2012. Origen y desarrollo de los *citrus* en Bella Vista, Corrientes. 1ª ed. Corrientes:INTA; [consultado el 12 de may. de 2020]. <https://inta.gob.ar/documentos/origen-y-desarrollo-de-los-citrus-en-bella-vista-corrientes>.
- Sáenz CA, Osorio E, Estrada B, Poot WA, Delgado R, Rodríguez R. 2019. Principales enfermedades en cítricos. *Revista Mex Cien Agra*; [consultado el 5 de may. de 2020]. 10(7):1653-65. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/1827>.
- Sarker I, Islam J, Shaekh MP, Rahman MM, Khan H, Chowdhury AS, Mukim MS, Islam R, Haque R. 2015. Establishment of a standard protocol for *in vitro* meristem culture and plant regeneration of *Citrus aurantifolia*. *J Pharm Biol Sci.* 10(2): 61-69.
- Sharma S, Singh B, Rani G, Zaidi A, Hallan VK, Nagpal AK, Virk GS. 2007. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. *India:Plant Cell Tiss Organ Cult*; [consultado el 15 de may. de 2020]. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9307-3>.
- Sharmin SA, Kabir AH, Mandal A, Sarker KK, Alam MF. 2008. *In vitro* propagation of Eggplant through meristem culture. *Agric Conspec Sci.*; [consultado el 11 de set. de 2020]. 73(3): 149-155. https://www.researchgate.net/publication/26541296_In_Vitro_Propagation_of_Eggplant_through_Meristem_Culture.
- Singh P, Singh BK, Singh SP, Padhi M. 2018. Micropropagation of Kinnow mandarin using nodal segments as explants. *J of Pharm and Phyt.*; [consultado el 10 de jul. de 2020]. 7(4):2224-2226. <http://www.phytojournal.com/archives/?year=2018&vol=7&issue=4&ArticleId=5267&si=false>.
- Srivastava PS, Narula A, Srivastava S. 2005. *Plant biotechnology and molecular markers.* India:Springer; [consultado el 27 de may. de 2020]. <https://link.springer.com/book/10.1007/1-4020-3213-7>.
- Statista. 2020. Ranking de los mayores países productores de limones y limas a nivel mundial en 2018: Según la cantidad de producción. Alemania: Statista Research Department; [actualizado el 21 de sep. de 2020; consultado el 7 de oct. de 2020]. <https://es.statista.com/estadisticas/613493/principales-paises-productores-de-limon-en-el-mundo/>.
- Tallón CI, Porras I, Pérez-Tornero O. 2012 Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*; [consultado 20 de jun. de 2020]. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9457-9>.
- Tavano EC, Stipp LC, Muniz FR, Mourao FA, Mendes BM. 2009. *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biol Plant.* 53, 395–399. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0075-2>.

- Vidal Rivera MV. 2014. Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales. [Tesis de pregrado]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 20p.
- Volk G, Krueger R, Moreland B, Bonnart R, Sheperd A. 2019. *Citrus* shoot tip cryopreservation. USA:CST; [consultado el 15 de jun. de 2020]. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/citrus-cryopreservation/#:~:text=The%20standard%20procedure%20for%20citrus,are%20placed%20into%20separate%20cryoboxes.>

7. ANEXO

Anexo 1. Protocolo de establecimiento de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle a partir de meristemas.

Protocolo de establecimiento *in vitro* de meristemas de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle)

Juan Alfonso Ojeda Ayala

Materiales

- 1) Varetas de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) con brotes axilares sin emerger.
- 2) Etanol (70%), Cloro líquido comercial (4.5% de NaClO), Tween® 80, agua destilada y agua destilada estéril.
- 3) Pinzas de acero, bisturí, gaza estéril, tubos de ensayo, papel aluminio, probeta, pipeta, beaker.
- 4) Estereoscopio.
- 5) Medio de cultivo estéril Murashige y Skoog modificado para establecimiento de lima ácida (Al-Khayri y Al-Bahrany 2001).

Cuadro 1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle).

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	400.000
	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 magnesio tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdeno de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetracético	50.000
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	1.000
		Piridoxina	1.000
		Ácido nicotínico	1.000
		Glicina	2.000
		Pantotenato de Ca	5.000
		BA o BAP	1.000
		Sacarosa	30,000.000
pH 5.8		Phytigel	18,000.000

Fuente: Al-Khayri y Al-Bahrany (2001).

Procedimiento de establecimiento

Recolección y preparación del material vegetal

- 1) Seleccionar ramas de color verde claro con brotes sin emerger.
- 2) Eliminar hojas y espinas.
- 3) Lavar superficialmente con agua y jabón.
- 4) Seccionar las varetas en segmentos nodales de 2-4 cm.



Figura 1. Selección y preparación de material de vegetal. A) planta madre, B) rama con brotes axilares sin emerger, C) varetas con hojas y espinas eliminadas, D) seccionamiento en segmentos nodales.

Desinfección del material vegetal

- 1) Sumergir los explantes en etanol al 70% durante 20 segundos y luego en solución NaClO al 15% (v/v) con dos gotas de Tween® y dejar reposar por 15 minutos.
- 2) Realizar triple lavado con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Extracción de domos meristemáticos

- 1) Eliminar las escamas.
- 2) Realizar un corte longitudinal por debajo del meristema y separarlo del segmento nodal.
- 3) Realizar cuatro incisiones en los costados del meristema.

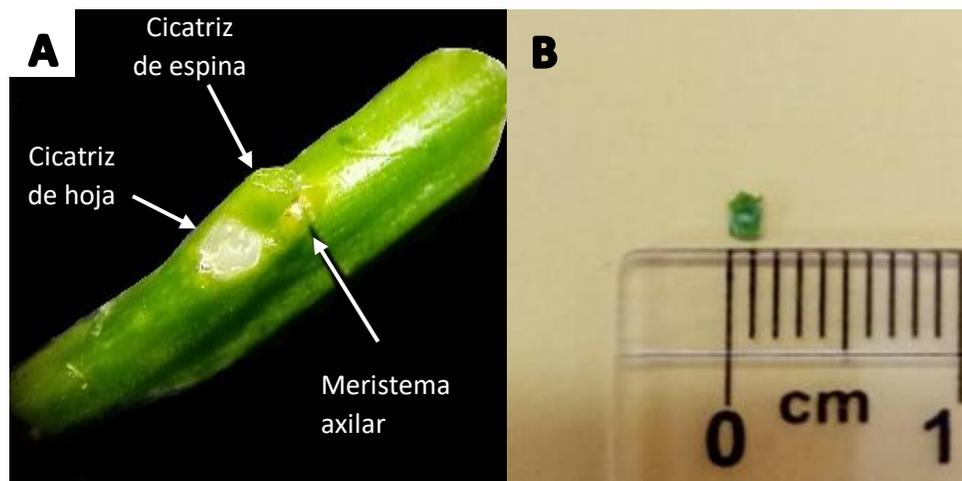


Figura 2. Extracción de meristema axilar de segmento nodal. A) partes del explante observado a través de microscopio (lente 10×), B) tamaño óptimo del meristema (1-1.5 mm).

Video referencia de cómo realizar la escisión del meristema axilar:

https://www.youtube.com/watch?v=CLDUZSHLOF4&feature=emb_logo.

Siembra

- 1) Colocar los meristemas extraídos en los tubos de ensayo.
- 2) Sellar con cinta plástica y rotular.

Incubación

- 1) 25 °C
- 2) 70% HR
- 3) 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante 16 h.

Bibliografía

- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Curr Sci.* 81(9):1242-1246.
- Volk G, Krueger R, Moreland B, Bonnard R, Sheperd A. 2019. *Citrus* shoot tip cryopreservation. USA:CST; [consultado el 15 de jun. de 2020]. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/citrus-cryopreservation/#:~:text=The%20standard%20procedure%20for%20citrus,are%20placed%20into%20separate%20cryoboxes>.