

INFLUENCIA DE SACAROSA Y COTILEDONES EN LA MICROINJERTACIÓN DE CÍTRICOS

Lihua Quispe, Liz Julieta^a; Calderón Rodríguez, Abelardo Ciro^a; Cabrera Pintado, Rosa María^{b*}

^aUniversidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias-Biología, Av. La Molina, La Molina, Lima, Perú,

^bInstituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Av. la Molina 1981, La Molina, Lima, Perú

Ingresado: 17/04/2018

Aceptado: 01/02/2019

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de seis tratamientos que combinan la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y el número de cotiledones del patrón, con la posibilidad de establecer un protocolo óptimo de microinjertación y su posterior uso potencial para la eliminación del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) de las variedades infectadas. Se utilizaron las semillas de Citrange Troyer y varetas de limón Eureka y naranjo Washington Navel para la optimización del protocolo de microinjertación. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento de desinfección de semillas fue 0,16% de NaClO durante 5 minutos, y para las varetas fue de 1% de NaClO durante 20 minutos. Además, se recomienda como protocolo de microinjerto óptimo, el uso de 45 g.L⁻¹ de sacarosa con un cotiledón en el patrón para el limón Eureka, y para el naranjo Washington Navel, la utilización de 45 g.L⁻¹ de sacarosa y un patrón sin cotiledones.

Palabras clave: Sacarosa, cotiledones, limón Eureka, microinjertación *in vitro*, naranjo Washington Navel.

INFLUENCE OF SUCROSA AND COTYLEDONS ON CITRUS MICROGRAFTING

Abstract

The objective of this work was to determine the influence of six treatments that combines sucrose levels in the culture medium and the number of cotyledons of the rootstock, in order to obtain an

optimal micrografting protocol for its subsequent potential use for the elimination of the Citrus Tristeza Virus (CTV) from *Citrus* infected cultivars. We used seeds of Citrange Troyer and fresh flushes of Eureka lemon and Washington Navel orange. Our results showed that the best disinfection treatment for seeds was 0,16% NaClO for 5 minutes, and for fresh flushes was 1% NaClO for 20 minutes. As well, we recommended as optimal micrografting protocol, to used 45 g.L⁻¹ of sucrose with one cotyledon in the rootstock for Eureka lemon, and Washington Navel orange, to use 45 or 75 g.L⁻¹ of sucrose and a rootstock without cotyledons.

Keywords: Sucrose, cotyledons, *in vitro* micrografting, lemon Eureka, orange Washington Navel.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los cítricos están entre los frutales más importantes a nivel mundial; [1] China y España ocupan el primer lugar en producción y exportación, respectivamente. Perú ocupa el cuarto lugar en producción a nivel de América del Sur, con 1 112 100 T y el séptimo lugar como exportador con 37 600 T de cítricos en total. [2] Los principales departamentos productores de cítricos en Perú son: Piura, Lambayeque, Lima, Ica, Junín y Cusco. [3]

Las plantas cítricas son susceptibles a enfermedades virales como la tristeza, psorosis, o viroides como la exocortis, [4] que influyen de forma determinante en la producción y rendimiento de las plantas. [5] Para su control es imprescindible utilizar material de propagación con certificación genética y fitosanitaria. [6]

* Correspondencia a: Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Av. la Molina 1981, La Molina, Lima. Teléfono: +51 999 045 224. Correo electrónico: rcabrera@inia.gob.pe

Para eliminar el virus del material de propagación se pueden aplicar métodos como la termoterapia, que elimina algunos virus como la tristeza de los cítricos, pero puede ser temporal o aparente y al cabo del tiempo se activa nuevamente el virus. [7] Otra metodología es el cultivo nucelar *in vitro*, que permite obtener plantas libres de virus pero con caracteres juveniles y esto retrasa la producción de frutos en los primeros años. [8] La protección cruzada se considera como método de erradicación; [9] sin embargo, se prefiere la microinjertación *in vitro* de meristemos caulinares [9, 10] porque es un método de saneamiento eficaz, pues supera los inconvenientes de los métodos anteriormente mencionados. La efectividad de saneamiento de esta técnica radica en que los virus y agentes similares en las plantas, suelen estar presentes en el floema y plasmodesmos, pero no en los ápices caulinares de tamaño adecuado (generalmente de menos de 0,5 mm) porque no tienen desarrollado ese tipo de tejido, más bien presentan alta concentración de citoquininas y auxina, permitiendo la elevada división celular vegetal e impidiendo la proliferación del virus en la zona meristemática. [7, 11] Y es una alternativa para la propagación de aquellos cítricos con frutos partenocárpicos. Se ha verificado la eficacia de este método mediante pruebas biológicas, logrando eliminar más de 80% de virus excortis, xyloporosis y stubborn, y 100% de virus de la tristeza de los cítricos. [9, 12]

Por otro lado, ciertos factores deben ser tomados en cuenta para el prendimiento de los microinjertos como la sacarosa en el medio de cultivo y los cotiledones del patrón. La sacarosa en el medio nutritivo, es esencial para el desarrollo de una planta *in vitro*, debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono por la planta. Esto se relaciona con la concentración de CO₂ en la atmósfera del tubo de ensayo, la cual no es siempre la más adecuada y con una iluminación de fuente artificial que probablemente resulte insuficiente. [11, 13]

Las semillas de los cítricos se caracterizan por ser dicotiledóneas; los cotiledones son los encargados de aportar los nutrientes necesarios para la germinación y el desarrollo de la radícula por la parte inferior y elongación de la plúmula en la parte superior, en los primeros estadios de desarrollo. [14]

Se ha reportado que utilizando 75 g.L⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo se obtuvo mayor porcentaje de prendimiento (30%-90%), [9] aunque en otro estudio concluyeron que con 20-30 g.L⁻¹ de sacarosa se favoreció el crecimiento de la planta *in vitro* en general, [13] y que los cotiledones del patrón aparentemente disminuían el crecimiento de los ápices injertados de diversos cítricos. [9]

Teniendo en cuenta investigaciones anteriores se decidió evaluar la influencia de los cotiledones y la concentración de sacarosa del medio de cultivo en la microinjertación de las variedades de limón Eureka (*Citrus limón* L. Burm) y naranjo Washington Navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de la región Huaral-Perú sobre el patrón Citrange Troyer (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*).

II. METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria, La Molina, Lima, Perú.

Se emplearon semillas de Citrange Troyer, provenientes de California del Lote 4A 51701 que habían recibido un previo tratamiento de termoterapia en agua a 52°C e hidroxiquinolina durante 10 minutos y conservadas en refrigeración (2-4°C), como patrones de los microinjertos. A estas se les desarrolló un protocolo de desinfección superficial y de siembra empleando una muestra de 150 unidades. El proceso fue como se describe a continuación: Se extrajo la testa y tegumento, bajo condiciones estériles de cámara de flujo laminar (ESCO, LHC-6A3, 2013-86965, Singapur). Se involucraron grupos de diez semillas en gasa estéril, sumergidos en alcohol 70° AIKOFARMA E.I.R.L (Perú) por un minuto, sumergidos en solución de lejía comercial 4% P/V (USA) (Tabla 1), adicionando tween 20 (dos gotas por cada 100 mL); se enjuagó tres veces con agua destilada estéril y sembró en tubos conteniendo medio sólido de Murashige y Skoog (MS) CAISSON LABS (4,43 g.L⁻¹) [10]. Luego se incubaron en un fitotrón durante uno a tres meses, a 27±2°C, 70% de humedad relativa y oscuridad total. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de semillas germinadas, oxidadas y contaminadas.

Para la desinfección de 100 unidades de varetas

de limón Eureka y naranja Washington Navel, primero se lavaron con abundante agua, detergente y un cepillo; se cortaron los extremos (15 cm de longitud aproximadamente); sumergieron en fungicida Benlate 50%WP - FARMEX S.A. (Perú) 2 g.L⁻¹ durante una hora; en alcohol 70° y finalmente en solución de hipoclorito de sodio (Tabla 1), más tween 20 (dos gotas por cada 100 mL). Todas las varetas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, y sembraron en medio sólido MS CAISSON LABS (4,43 g.L⁻¹), suplementado con vitaminas White [15]. Se incubó en un fitotrón (Thermo Fisher Scientific, 3949, USA) por dos semanas, a 32°C, con un fotoperiodo de 16 hora luz, intensidad luminosa de 1000 lux y 70% de humedad relativa. Los ensayos para la determinación, la concentración de NaClO y tiempo de inmersión para desinfección superficial de semillas y varetas se describen en la Tabla 1. Las variables evaluadas fueron porcentaje de varetas contaminadas, oxidadas y desarrollo de brotes por varetas. Debido a las condiciones de incubación mencionadas, las semillas germinaron en corto tiempo, en plántulas etioladas con tejido blando, lo que permitió emplearlas en la microinjertación.

Los tratamientos testigo para el caso de semillas y varetas fueron tomados de un protocolo de desinfección ya establecido por MGAP [16] el cual consistía en sumergir las semillas y varetas en una solución de NaClO (0,16%) durante cinco minutos y NaClO (0,88%) durante diez minutos, respectivamente.

Tabla 1: Tratamientos de desinfección superficial de semillas patrón y varetas. Adaptado de [38]

	Tratamientos	Unidades Experimentales	[NaClO] (%)	Tiempo (minutos)
Semillas	T ₁	30	0.08	5
	T ₂	30	0.16	10
	T ₃	30	0.20	10
	T ₄	30	0.80	10
Varetas	T ₁	20	0.70	10
	T ₂	20	0.88	20
	T ₃	20	1.00	20
	T ₄	20	1.50	20

Luego se realizó la microinjertación; la cantidad muestral fue 180 microinjertos para cada variedad; seis tratamientos (combinación de 0, 1, 2 cotiledones y 45 g.L⁻¹, 75 g.L⁻¹ de sacarosa); diez microinjertos representaban a las unidades experimentales de cada tratamiento, con tres repeticiones. El proceso

se realizó en condiciones estériles de cámara de flujo laminar. Se tomó cada plántula etiolada de Citrange Troyer obtenidas de las semillas sembradas anteriormente; se cortaron las raíces secundarias y parte de la raíz principal, además de los cotiledones (0; 1 y 2, según tratamiento), dejando 4-5 cm de longitud del tallo y 2-3 cm de longitud de la raíz.

Haciendo uso de un microscopio estereoscopio se realizó un corte en "T invertida" en el extremo superior del tallo. Luego, se tomó una varetas de limón Eureka o de naranja Washington Navel con brotes de al menos 2 cm de longitud; se procedió al aislamiento del meristemo caulinar, usando un bisturí N°11 y pinza de punta fina, y disectó el meristemo. Después, el meristemo aislado se insertó dentro de la incisión del corte T invertida del epicótilo de la plántula del portainjerto, abriéndose el tejido epidérmico se colocó a la altura del cambium vascular. Cada plántula microinjertada se introdujo dentro de un tubo de ensayo que contenía al medio de cultivo líquido de MS, [10] suplementado con vitaminas White, [15] con la concentración de sacarosa de 45 g.L⁻¹ ó 75 g.L⁻¹ según tratamiento y además contenía un soporte de papel filtro doblado con un orificio en el centro, en el cual se hizo pasar la raíz. Se sellaron, rotularon e incubaron a 26±2°C y fotoperiodo de 16 horas luz; intensidad luminosa 5180 lux y 70% de humedad relativa. Las variables evaluadas fueron porcentaje de microinjertos prendidos a los 28 días; el número, tamaño y marchitez de hojas a los 63 días de la microinjertación.

Se identificó como microinjerto prendido, aquella plántula que después de microinjertarla presentó hojas unifoliales en desarrollo, las cuales correspondían a la variedad microinjertada.

Para la evaluación de longitudes de hojas se clasificaron en tres intervalos de tamaño (Tabla 2) empleando una adaptación de la regla de Sturges, [17] con el fin de efectuar las comparaciones posteriores. Tomando en cuenta los siguientes datos obtenidos en la microinjertación: la longitud de hoja de los microinjertos prendidos más pequeña (1 mm) y la longitud más grande (34 mm) y que eran 6 tratamientos evaluados.

Tabla 2: Intervalo de clasificación para determinación del tamaño de hojas de microinjertos prendidos. [38]

Tamaño	intervalo (mm)
Hojas pequeñas	[1,12>
Hojas medianas	[12,23>
Hojas grandes	[23,35]

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA cuando cumplieron las condiciones de normalidad y homogeneidad, mediante la prueba Shapiro-Wilks y la prueba de Levene, respectivamente; de lo contrario se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis a un nivel de confianza de 95%. Para analizar los datos se empleó el programa de InfoStat versión estudiantil 2017.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección superficial del patrón Citrange Troyer

La evaluación de desinfección superficial se realizó después de un mes de la siembra; el mejor tratamiento fue el "Testigo", el cual mostró menor contaminación (1,67%), mayor porcentaje de germinación (86,67%) y ausencia de semillas oxidadas (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentajes de contaminación, germinación y oxidación de semillas portainjerto sembradas en diferentes tratamientos. Adaptado de [38]

Tratamientos(T)	Contaminación(%)	Germinación(%)	Oxidados(%)
Testigo	1,67 AB§	86,67 B§	0 A§
T ₁	30 B	63,33 B	0 A
T ₂	1,67 AB	10 AB	55 AB
T ₃	0 A	0 A	93,33 B
T ₄	0 A	0 A	100 B

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$), según la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

Aunque el incremento en concentración de agente desinfectante y tiempo de inmersión ayudaron a disminuir el porcentaje de contaminación, estos procesos también tuvieron como consecuencia el deterioro de los tejidos de la semilla, tal como se evidencia en la disminución del porcentaje de germinación y el incremento en el porcentaje de semillas oxidadas. El detrimento en la germinación a concentraciones elevadas de NaClO también es evidenciado en el experimento llevado a cabo por Rojas, [18] cuyo resultado óptimo de desinfección se obtuvo con un tratamiento de 25% de lejía comercial (aproximadamente 1% de NaClO) por 10 minutos,

aunque con no más de 55% de germinación exitosa de las semillas.

Los resultados del presente trabajo difieren de lo encontrado en otro experimento que empleó a los patrones citrumelo y carrizo, el cual señala un logro de aproximadamente 90% de germinación usando 0,4% de NaClO por 8 minutos en ambos casos, aunque con un ligero porcentaje de contaminación (menor al 10%). [19] El éxito en la germinación a una concentración elevada de NaClO reflejaría una mayor resistencia de los patrones mencionados respecto al patrón Citrange Troyer durante el proceso de desinfección. Es importante considerar que la germinación y la pérdida de viabilidad también dependen de la constitución genética. [20]

Aun cuando la germinación lograda en el experimento resultó elevada empleando el tratamiento testigo de desinfección, las plántulas emergentes presentaron una vigorosidad variable, llegando algunas a no desarrollar el sistema radicular, e incluso otras demoraron en germinar entre dos a tres meses. Una explicación podría ser la sensibilidad que posiblemente presentó Citrange Troyer a la temperatura de conservación (2-4°C). Tal como lo evidencian Figueroa et al. [21] en su experimento, un periodo de conservación en frío de 3 meses no solo reduce el porcentaje de germinación de Citrange hasta un 20%, sino también retarda el proceso hasta dos meses.

Desinfección superficial de varetas para la obtención de meristemos

La evaluación del porcentaje de contaminación, oxidación y brotación de las varetas se realizó después de 10 días posteriores a la siembra.

Según el análisis estadístico, los resultados de la desinfección superficial de varetas presentados en las Tablas 4 y 5, para limón Eureka y naranjo Washington Navel, respectivamente, muestran que no hubo diferencias significativas (a un p-valor $\leq 0,05$) entre los tratamientos para la variable porcentaje de contaminación, obteniéndose en todos los tratamientos altos porcentajes de contaminación. El mejor tratamiento T₃ (con 1% de NaClO por 20 minutos) presentó 85% y 74,33% de contaminación en limón Eureka y en naranjo Washington Navel, respectivamente.

Tabla 4: Porcentaje de contaminación, oxidadas y producción de brotes de las varetas de limón Eureka en diferentes tratamientos de desinfección superficial. [38]

Tratamientos(T)	Contaminación de varetas (%)	Varetas oxidadas(%)	Nº de brotes por vareta
Testigo	96,67 ^{AB}	0 ^{A§}	1,67 ^{AB§}
T ₁	100,00 ^a	0 ^A	0,67 ^A
T ₂	93,33 ^A	0 ^A	2 ^{AB§}
T ₃	85,00 ^A	0 ^A	3,67 ^B
T ₄	95,00 ^A	95 ^B	1 ^A

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

Tabla 5: Porcentaje de contaminación, oxidadas y producción de brotes de las varetas de naranjo Washington Navel en diferentes tratamientos de desinfección superficial. [38]

Tratamientos(T)	Contaminación de varetas (%)	Varetas oxidadas(%)	Nº de brotes por vareta
Testigo	96,67 ^{A§}	0 ^{A§}	1,67 ^{AB§}
T ₁	100,00 ^A	0 ^A	0 ^A
T ₂	91,67 ^A	0 ^A	1,33 ^{AB}
T ₃	74,33 ^A	0 ^A	3,33 ^B
T ₄	90,00 ^A	100 ^B	0 ^A

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

La alta contaminación de las varetas se puede deber a que procedían de plantas leñosas de condición adulta, cultivadas directamente en campo y expuestas a muchos agentes contaminantes. A pesar de los valores altos de contaminación de los explantes, se pudo extraer yemas recién desarrolladas que se ubicaban en la parte superior de la vareta. Estos altos porcentajes de contaminación también se han reportado en varios trabajos. El empleo de 0.67% [22] o 0.4-1.2% [23] de NaClO por 15 minutos no fueron suficientes para la desinfección de patógenos externos, obteniéndose finalmente 56% y 50% a 100% de contaminación, respectivamente, en todos estos tratamientos.

Con respecto a la variable porcentaje de varetas oxidadas, los mejores tratamientos fueron el testigo, T₁, T₂ y T₃ con 0% de oxidados para ambas variedades. En los tratamientos donde se oxidaron gran porcentaje de varetas, se debería a la actividad de la enzima polifenol oxidasa ya que se encuentra en plantas leñosas y aumenta su actividad a altas concentraciones de NaClO, catalizando la reacción entre varios compuestos fenólicos y oxígeno

molecular para producir quinonas, las cuales pueden inhibir el crecimiento e incluso causar la muerte celular de explantes cuando el tejido vegetal se ve afectado por lesiones internas. Pequeño et al., [24] encontraron que a 3,24% del NaClO ocasionaba un aumento de la actividad de la enzima polifenol oxidasa en hojas y peciolo de *Jatropha curcas* cuando eran desinfectados superficialmente, manifestándose pardeamiento de los tejidos. Por tanto, se seleccionó al tratamiento T₃ para la desinfección superficial de varetas de ambas especies, porque aun cuando el porcentaje de contaminación fue alto, las varetas de este tratamiento presentaron menor porcentaje de necrosamiento, y mayor número de brotes desarrollados.

Porcentaje de prendimiento-microinjertación

En la Fig. 1, se esquematizaron los resultados de porcentaje de prendimiento de limón Eureka; se observó la "barra" del tratamiento 4 (75 g.L⁻¹ de sacarosa y 2 cotiledones) muy pequeña en altura (al nivel de 0%), esto porque en este tratamiento no hubo ningún microinjerto prendido, por lo que de aquí en adelante ya no fue considerado el efecto del tratamiento 4 en las siguientes variables evaluadas. También se observa diferencia significativa (a p -valor < 0.05 y distinguiéndose con las letras "A" y "B") entre los promedios de porcentaje de prendimiento de los distintos niveles del factor concentración de sacarosa. Los tratamientos con 45 g.L⁻¹ de sacarosa presentaron mayor prendimiento (13,33%) que los de 75 g.L⁻¹ (4,44%) de sacarosa. Esto contradice lo encontrado en otros trabajos similares. Por ejemplo, se ha reportado que 75 g.L⁻¹ de sacarosa influye positivamente en el éxito del injerto, obteniéndose entre 30 a 90% de prendimiento de ápices de naranjos, de mandarino, pomelos y qumkuats sobre el patrón Citrange Troyer. [9] Así también, con el uso de 70 g.L⁻¹ de sacarosa se reportó un 38% de microinjertos, frente al 21% conseguido con el uso de 30g.L⁻¹ en la microinjertación de mandarina Kinnow y naranja dulce Succari, ambos sobre Limón Rough (*Citrus jambhiri* Lash). [25]

Los resultados del presente experimento podrían ser explicados al considerar que por un tiempo, la sacarosa a altas concentraciones en el medio de cultivo también se comporta como un agente osmótico, [26] provocando deshidratación temporal en toda la planta patrón, lo cual también pudo haber

afectado el prendimiento del meristemo. Además, es posible la incompatibilidad entre el patrón y la variedad injertada, lo cual también justificaría el bajo porcentaje promedio obtenido a 45 g.L⁻¹ (13,33%) en comparación a los otros trabajos mencionados.

No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos respecto al número de cotiledones; tampoco hubo interacción entre la concentración de sacarosa y número de cotiledones. No obstante, el tratamiento que correspondía al uso de 45 g.L⁻¹ de sacarosa y un cotiledón del portainjerto (Tratamiento 2) resultó con mayor porcentaje de prendimiento que todos los tratamientos, con un promedio de 16,67%.

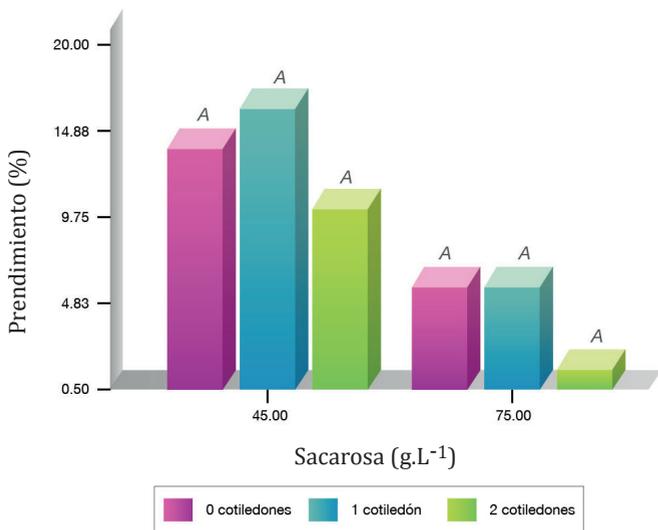


Fig. 1: Porcentaje de prendimiento de limón Eureka sobre Citrange Troyer Adaptado de [38]

En cuanto a los resultados obtenidos en el prendimiento del naranjo Washington Navel, el tratamiento que correspondía al uso de 45 g.L⁻¹ y cero cotiledones fue mejor que los otros 5 tratamientos realizados, alcanzando el 30% de prendimiento, esto se puede observar en la Fig. 2; no se evidenció interacción entre la concentración de sacarosa y número de cotiledones, tampoco hubo diferencia significativa en los tratamientos para concentración de sacarosa. El “número de cotiledones” tuvo influencia mostrando diferencia significativa (p-valor<0,05) entre los tratamientos. Los tratamientos con patrones sin cotiledones tuvieron 26,67% de prendimiento, que es mayor a los

tratamientos con patrones con un cotiledón (16,67% de prendimiento) o con dos cotiledones (11,67% de prendimiento). Navarro, [9] afirmó que observó mayor brotación de yemas axilares del patrón en los microinjertos con cotiledones, aunque no encontró diferencia significativa en los tratamientos por este factor, lo que posiblemente significaría que la presencia de los cotiledones sirvieron como reserva de nutrientes e indujeron el brote de yemas axilares del patrón, ya que inicialmente la alta concentración de sacarosa se está comportando como agente osmótico, [26] pero al mismo tiempo interfirieron en el prendimiento, observándose bajo porcentaje de éxito en los microinjertos con cotiledones.

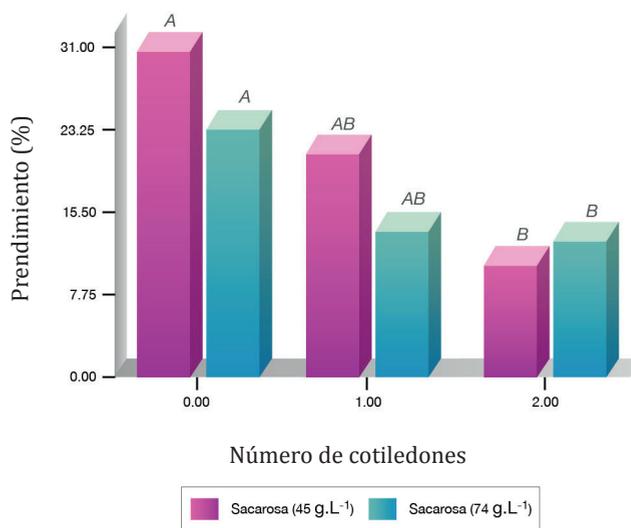


Fig. 2: Porcentaje de prendimiento de naranjo Washington sobre Citrange Troyer Adaptado de [38]

En general, el bajo porcentaje de prendimiento de limón Eureka se debe al problema de afinidad e incompatibilidad con el portainjerto Citrange Troyer; a diferencia de naranjo Washington Navel que es más compatible con el patrón, [27] y se obtuvo más microinjertos prendidos.

La morfología de los meristemos, es un factor que puede influir. Un estudio realizado sobre los meristemos de *Arabidopsis thaliana*, mencionan que la estructura del meristemo no cambia (tres zonas: central, superior y periféricas), pero sí la morfología. Además, afirman que las especies mutadas presentan sobreexpresión o poca expresión del gen original, cambiándole a una forma de mayor volumen, achatada o alargada. [28] En esta investigación, se

observó que limón Eureka presentaba un meristemo más pequeño y fácilmente identificable, lo cual permitía realizar con mayor rapidez y con menos manipulación su inserción en el corte "T invertido", a diferencia de naranjo Washington Navel, que es una especie mutada, presentando un meristemo de mayor volumen algo achatado, y la microinjertación se realizó con mayor cuidado y tiempo, tanto en la disección de primordios como en la inserción en el patrón.

Por otro lado, existen trabajos de microinjertaciones *in vitro* en los cuales realizaron pretratamientos a los brotes apicales de algunos cítricos y otras especies, como por ejemplo, en un trabajo, los brotes de limón Clementina y naranjo amargo, entre otras especies se sumergieron en una solución de zeatina 0,1 mg.L⁻¹ antes de realizar la inserción en el patrón y obtuvieron hasta 64% de prendimiento, [29] o en otro, al sumergir los brotes de toronja Star Ruby en 10 mg.L⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético o en 1 mg.L⁻¹ de kinetina durante cinco minutos lograron duplicar el porcentaje de prendimiento, alcanzando hasta un 75%. [30]

La aplicación de reguladores de crecimiento es una opción que se podría considerar, aunque esto implicaría mayor estudio para la comprensión sobre funcionalidad de los fitorreguladores. La destreza del microinjertador, la rapidez con que prepara el patrón, el aislamiento del ápice y su inserción sobre patrón, [31] el grado de estrés que se le pueda producir al meristemo o al patrón durante el proceso de microinjertación, además del material con que se trabaja como edad del patrón [32] son otras de las razones por las cuales el porcentaje de éxito de prendimiento de microinjertos se ve reducida.

En la Fig. 3 se presentan microinjertos prendidos de limón Eureka, obsérvese que en el tratamiento T₄ (75 g.L⁻¹ de sacarosa y 2 cotiledones) no prendió ningún microinjerto. En la Fig. 4 se muestra microinjertos prendidos de naranjo Washignton Navel.

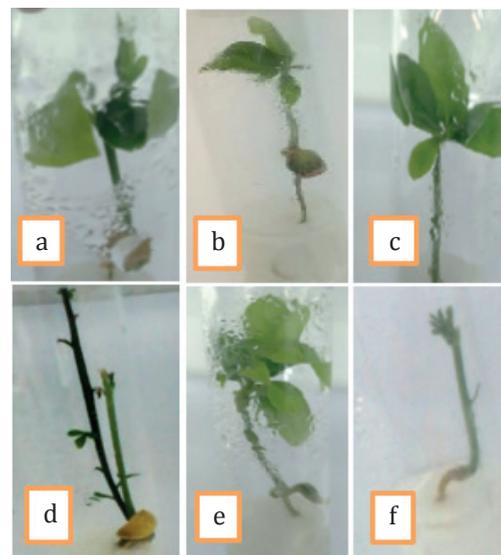


Fig. 3: Microinjertos prendidos de limón Eureka sobre Citrange Troyer. a) Tratamiento 1 (45 g.L⁻¹ sacarosa con 2 cotiledones); b) Tratamiento 2 (45 g.L⁻¹ sacarosa y 1 cotiledón); c) Tratamiento 3 (45 g.L⁻¹ sacarosa y 0 cotiledones); d) Tratamiento 4 (75 g.L⁻¹ sacarosa y 2 cotiledones); e) Tratamiento 5 (75 g.L⁻¹ sacarosa y 1 cotiledón); f) Tratamiento 6 (75 g.L⁻¹ sacarosa y 0 cotiledones). Adaptado de [38]



Fig. 4: Microinjertos prendidos de naranjo Washignton Navel sobre Citrange Troyer, los círculos rojos muestran las hojas desarrolladas del microinjerto prendido, a) Tratamiento 1 (45 g.L⁻¹ sacarosa y 2 cotiledón); b) Tratamiento 2 (45 g.L⁻¹ sacarosa y 1 cotiledón); c) Tratamiento 3 (45 g.L⁻¹ sacarosa y 0 cotiledones); d) Tratamiento 4 (75 g.L⁻¹ sacarosa y 2 cotiledones); e) Tratamiento 5 (75 g.L⁻¹ sacarosa y 1 cotiledón); f) Tratamiento 6 (75 g.L⁻¹ sacarosa y 0 cotiledones). Adaptado de [38]

Número de hojas desarrolladas en los microinjertos prendidos

El desarrollo de hojas en los microinjertos se identificó por ser unifoliado, que se dispusieron en forma de roseta, obtenido luego de 63 días de realizada la microinjertación, considerándose como una unidad experimental a cada uno de los microinjertos exitosos.

Los datos representados en la Fig. 5 corresponden al número de hojas desarrolladas por el microinjerto de limón Eureka. Se observa que hay diferencia entre medias de los tratamientos de concentración de sacarosa de los microinjertos de limón Eureka, aplicándose la prueba comparativa Tukey a un nivel de confianza de 95%.

Se ha obtenido 6 hojas promedio desarrolladas del ápice meristemático de los microinjertos tratados con 45 g.L⁻¹ de sacarosa, y 3 hojas promedio desarrolladas en los tratamientos con 75 g.L⁻¹ de sacarosa. Posiblemente, podría deberse a la influencia del buen desarrollo de vascularización entre el meristemo y el patrón que permitiría un adecuado flujo de nutrientes y hormonas (como auxinas y giberelinas), [33] y así se favorezca el desarrollo de hojas del microinjerto. Sin embargo, se encontraron investigaciones que a 75 g.L⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo se promueve el aumento progresivo de nuevas hojas. [9,12]

El número de hojas desarrolladas no fue influenciado por el número de cotiledones, obteniéndose entre 4,5 a 6 hojas promedio, sin mostrar diferencias significativas.

Para el caso de los microinjertos de naranja Washington Navel, los resultados mostraron que los microinjertos prendidos que desarrollaron más hojas fueron aquellos tratados con una concentración de 75 g.L⁻¹ de sacarosa y dos cotiledones (5 hojas); los que desarrollaron menos hojas fueron aquellos tratados con una concentración de 75 g.L⁻¹ de sacarosa y cero cotiledones (2 hojas); sin embargo, estadísticamente estos promedios no arrojaron diferencias significativas, tampoco se observó por el factor “número de cotiledones” del portainjerto (Fig. 6).

Estos resultados se ven justificados por el fundamento planteado de Agusti, [34] quien sostiene que la microinjertación se basa en la actividad celular y propone que la microinjertación se debe realizar a condiciones de temperatura media que puede encontrarse entre 15-30°C; este aspecto es para simular las condiciones naturales de la época idónea de las variedades para la injertación, en condiciones naturales de campo, para garantizar la unión del meristemo al patrón, de este modo se lograría más injertos exitosos y mejor desarrollo de hojas a partir del ápice meristemático. En el presente trabajo los microinjertos se incubaron a 26±2°C, encontrándose dentro del intervalo, lo que posiblemente pudo interferir en el desarrollo de las hojas de todos los microinjertos. El bajo porcentaje de microinjertos con hojas desarrolladas en naranja Washington Navel, puede deberse a la época de muestreo de las varetas para la obtención de ápices vegetativo. [29] En el Perú la época de brotación de naranja Washington Navel es después de la época de cosecha (mediados de mayo, junio, julio, setiembre); para el caso de limón Eureka la cosecha se realiza durante todo el año.

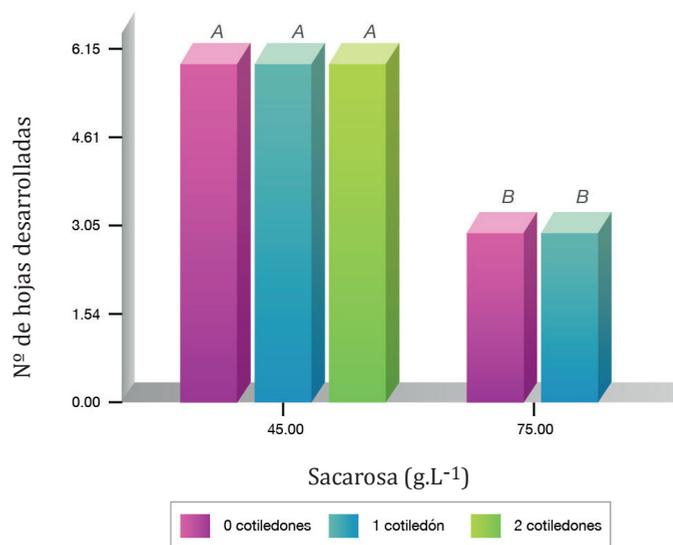


Fig. 5: Número de hojas desarrolladas de los microinjertos limón Eureka sobre Citrange Troyer. Adaptado de [38]

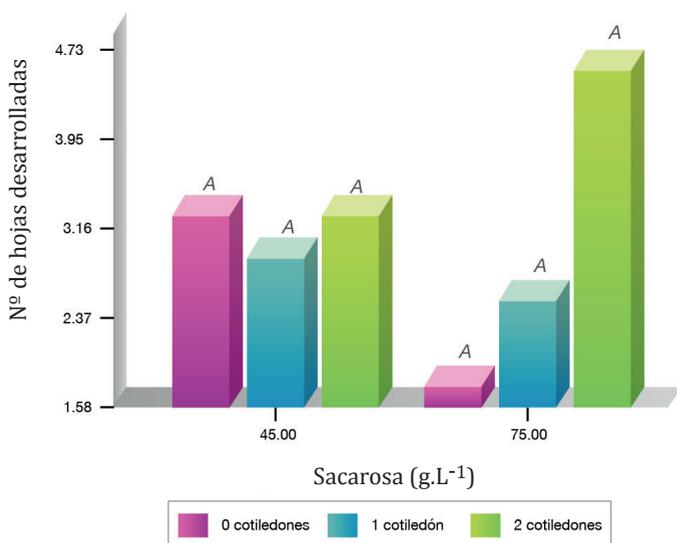


Fig. 6: Número de hojas desarrolladas de los microinjertos de naranjo Washington Navel sobre Citrange Troyer. Adaptado de [38]

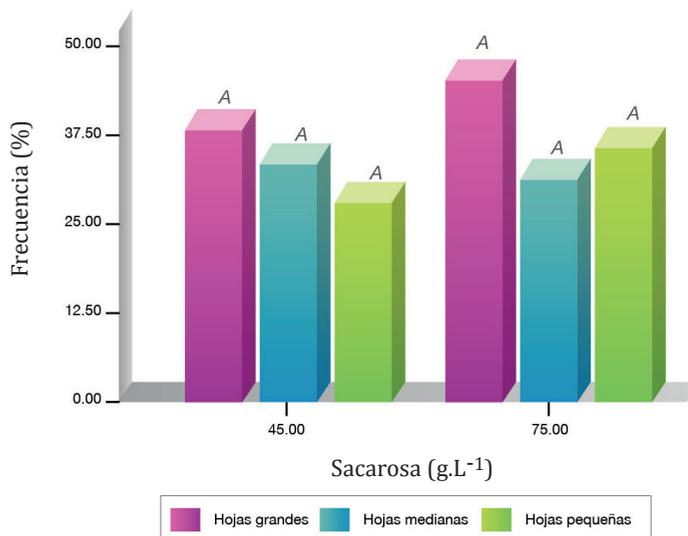


Fig. 8: Tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka respecto a la concentración de sacarosa. Adaptado de [38]

Tamaño de hojas de los microinjertos prendidos

La evaluación de la influencia del “número de cotiledones” en el tamaño de hojas de microinjertos de limón Eureka, mostraron que los tratamientos con dos cotiledones presentaron mayor cantidad de “hojas grandes” (58,57%), seguido de los tratamientos con un cotiledón (51,43%) y los tratamientos con cero cotiledones (12,5%), pero estadísticamente no hubo diferencia significativa (p -valor > 0,05) (Fig. 7). Lo mismo ocurrió con el efecto de la concentración de sacarosa (Fig. 8), no se tuvo diferencias significativas entre los tratamientos: Los tratamientos con 45 g.L⁻¹ de sacarosa presentaron 50% de hojas grandes mientras que los tratamientos con 75 g.L⁻¹, presentaron 40% de hojas grandes

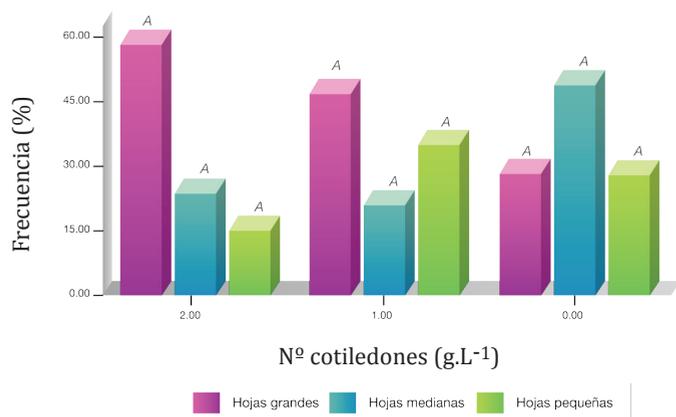


Fig. 7: Tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka respecto al número de cotiledones. Adaptado de [38]

A partir de los resultados de los tratamientos con diferente número de cotiledones del patrón en los microinjertos de naranjo Washington Navel (Fig. 9), se puede observar que los tratamientos con un cotiledón presentaron más hojas grandes (31,94% hojas grandes) que en los tratamientos con dos cotiledones (7,94% de hojas grandes) o con cero cotiledones (0% de hojas grandes). También se puede afirmar que en cada tratamiento se presentan más hojas pequeñas que hojas grandes.

Sin embargo, estadísticamente no se observa diferencia significativa. En los tratamientos con 2 cotiledones se obtuvo 53,44% de hojas pequeñas, en los tratamientos con un cotiledón se tuvo 36,11% y en el tratamiento con cero cotiledones fue 72,22%. Se reafirmaría que el tamaño de las hojas de los microinjertos es independiente del número de cotiledones.

Similarmente, en la evaluación de la influencia de la concentración de sacarosa sobre el tamaño de hojas de los microinjertos de naranjo Washington Navel no se observa diferencia significativa entre los tratamientos (Fig. 10), pese a que el tratamiento con 45 g.L⁻¹ de sacarosa haya presentado 21,3% de hojas grandes, mientras que los tratamientos con 75 g.L⁻¹ de sacarosa desarrollaron más hojas pequeñas (6,17% de hojas grandes).

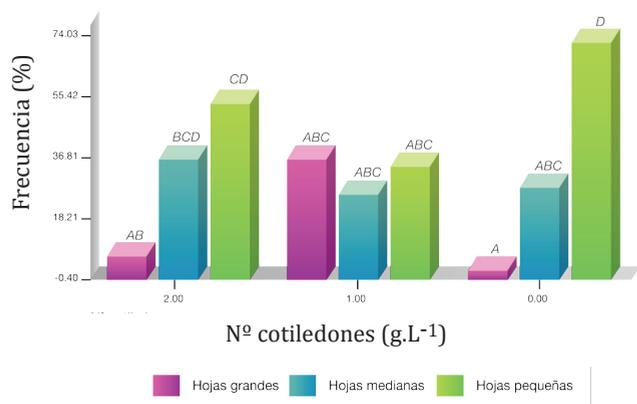


Fig. 9: Tamaño de hojas de los microinjertos de naranjo Washington Navel respecto al número de cotiledones. Adaptado de [38]

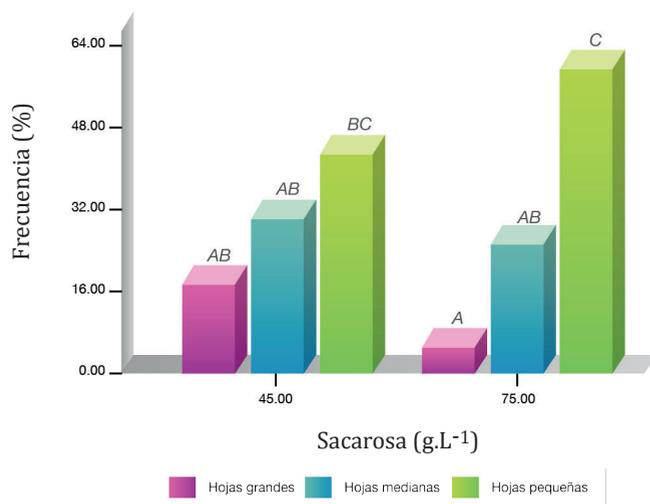


Fig. 10: Tamaño de hojas de los microinjertos de naranjo Washington Navel respecto a la concentración de sacarosa. Adaptado de [38]

El número de cotiledones y la concentración de sacarosa no influenciaron sobre el tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka y naranjo Washington Navel. Esto se debe a que ya no es necesaria la presencia de los cotiledones, la planta principalmente absorbe los nutrientes del medio de cultivo porque en este momento la sacarosa se metabolizó y sirve como fuente de energía, para el desarrollo de la planta microinjertada. [25] Estos resultados concuerdan con las conclusiones obtenidas por Navarro. [9]

Como una observación adicional se puede mencionar que pocos microinjertos (de Washington Navel y limón Eureka) desarrollaron más de 2 hojas rápidamente, posiblemente por la predominancia del desarrollo del ápice meristemático y en la mayoría de microinjertos, el desarrollo de los brotes del patrón representaron una competencia contra el microinjerto, al que le resta vigor y retarda el desarrollo de meristemo microinjertado, [35] como se evidenció en los otros tratamientos, que fue impulsado por la decapitación apical del epicótilo del patrón que se realizó durante la microinjertación *in vitro*, este hace que se pierda la dominancia apical y se promueve el crecimiento de brotes axilares del patrón. [36]

La baja concentración de sacarosa (15 a 25 g.L⁻¹) causa formación de xilema; mientras la alta concentración (30 a 40 g.L⁻¹) causa formación del floema, y las concentraciones intermedias (25-30 g.L⁻¹) inducen por lo general xilema y floema con cambium entre ambos. [33] En la presente investigación se empleó 45 g.L⁻¹ y 75 g.L⁻¹ de sacarosa, la cual se puede considerar como alta concentración, y en consecuencia se haya formado floema y casi nada de xilema, causando un desbalance en el sistema vascular y afectando el desarrollo de las hojas.

Hojas marchitas de los microinjertos prendidos

En la Fig. 11, se presenta una gráfica de comparación múltiple de la prueba comparativa Tukey para la variable porcentaje de hojas marchitas y se observa que los tratamientos con mayor concentración de sacarosa (75 g.L⁻¹) presentan más hojas marchitas, cloróticas o caída de hojas, con lo cual se evidencia la influencia de la concentración de sacarosa en el desarrollo óptimo de hojas de los microinjertos.

En la evaluación de las hojas marchitas de los microinjertos de naranjo Washington Navel, los tratamientos no evidenciaron diferencias significativas (Fig. 12), aunque el promedio de hojas marchitas de los tratamientos con 45 g.L⁻¹ de sacarosa presentaron el 30%, en comparación con los tratamientos de 75 g.L⁻¹ de sacarosa que presentaron el 50%.

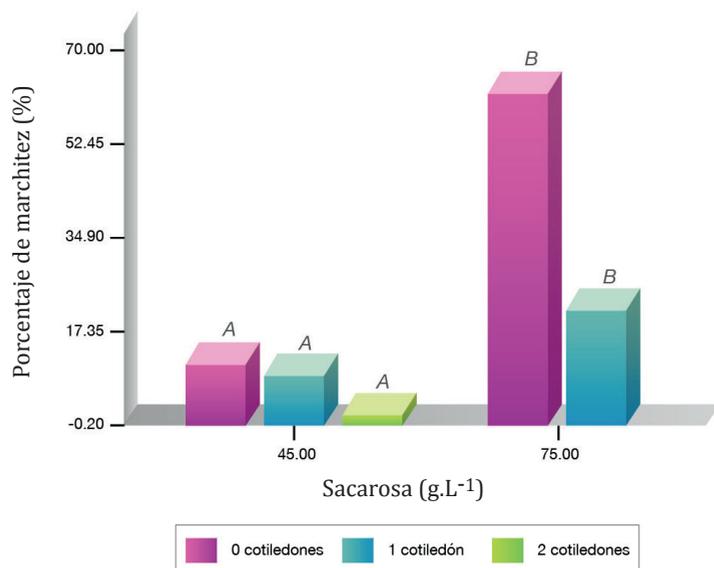


Fig. 11: Hojas marchitas en los microinjertos de limón Eureka sobre Citrange Troyer. Adaptado de [38]

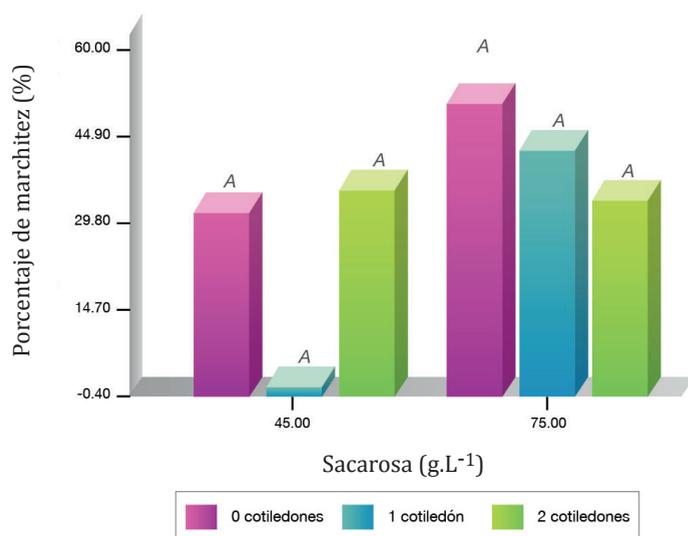


Fig. 12: Hojas marchitas en los microinjertos de naranjo Washington Navel sobre Citrange Troyer. Adaptado de [38]

Desde el punto de vista fisiológico, se afirma que los brotes del patrón tienen más posibilidades de desarrollarse y se recomienda el desbrotamiento de ápices axilares del patrón porque pueden ser la causa de la decadencia de las hojas de los microinjertos. [35] Esto demuestra que la marchitez se debió a la predominancia de la generación de los brotes del patrón, impidiendo el desarrollo de los microinjertos y a su vez provocándoles clorosis como síntoma de la deficiencia de nitrógeno por una disminución en la formación de clorofila, lo que dificultaría las

actividades enzimáticas, por ser componente de las paredes celulares. [37]

IV. CONCLUSIONES

El mejor tratamiento de desinfección superficial de semillas del patrón fue 0,16% de NaClO durante 5 minutos y para las varetas fue 1% de NaClO durante 20 minutos. La concentración de sacarosa tuvo influencia en el prendimiento, en el número de hojas desarrolladas y marchitez, y no sobre el tamaño de hojas desarrolladas de los microinjertos de limón Eureka. El número de cotiledones no influyó en la microinjertación de limón Eureka. La microinjertación de naranjo Washington Navel fue influenciado por el número de cotiledones, esto se evidenció al evaluar el porcentaje de prendimiento, y ligeramente por la concentración de sacarosa.

V. AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Innovación Agraria por el financiamiento del proyecto “Establecimiento de Bloques Fundación de material de propagación de cítricos libre de Virus, Viroides y HLB, mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas de saneamiento con fines de implementación de un programa nacional de certificación de cítricos”, y la tesis descrita en [38], del cual se tomó la información como base para la presente publicación.

VI. REFERENCIAS

- [1] S. Zaragoza, J. Pina, M. Forner, L. Navarro, A. Medina, G. Soler, P. Fuster (2011) “Las variedades de cítricos. El material vegetal y el registro de variedades comerciales de España”, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, pp. 49.
- [2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO (2017) “Mercados principales de cítricos y jugos de cítricos orgánicos” [Internet], [Citado 15 nov 2017], Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>.
- [3] Ministerio de Agricultura – MINAGRI (2008) “Cítricos” [Internet], [Citado 28 nov 2017], Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/organizaciones/dgca/citricos.pdf>.
- [4] I. Estévez (2014) “Comportamiento de

las densidades de población de *Aphis spiraecola* Patch (Hemiptera: Aphididae) ante la presencia de *Cycloneda sanguinea limbifer* Csy y larvas de Syrphidae en el naranjo 'Valencia' (*C. sinensis* (L.) Osbeck.)", Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. CitriFru. 31(2), 15-19.

[5] M. J. Hernandez, A. A. Lopez, F. Osorio, F. G. Lopez, H. L. Moctezuma, M. M. Rosas (2006) "Cultivo in vitro de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar", *Interciencia* 31(8), 616-619.

[6] U. Vegas, M. Narrea (2011) "Manejo integrado del cultivo del limón", UNALM-AGROBANCO, Piura, Perú. [Internet], [Citado 10 ene 2018]. Disponible en: http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/CapacitacionesProductores/Limon/MANEJO_INTEGRADO_DEL_CULTIVO_DE_LIMON.pdf

[7] L. Pina (2009) "Propagación de plantas. Aplicaciones de la Biotecnología a la propagación de plantas" Universidad Politécnica de Valencia, 13(193), 298-313.

[8] L. Navarro (1979) "Micro injerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus", *Serv. Plagas*, 5 (2), 127-148.

[9] C. N. Roistacher, J. V. Da Graça, G. W. Müller (2010), "Cross Protection Against Citrus tristeza virus - a Review", *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, 17(17), 1-27.

[10] T. Murashige y F. Skoog (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*. 15 (1), 473-497.

[11] R. Pierik. (1990) "Cultivo in vitro de las plantas superiores". Madrid. S.A. Mundi-Prensa.

[12] L. Navarro y J. Juárez. (2005) "La revolución citrícola. Microinjertación de ápices caulinares de cítricos in vitro", [Internet], [Citado 15 nov 2017]. *Phytoma*. 170 (8). Disponible en: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/170-junio-julio-2005/microinjerto-de-pices-caulinares-de-citricos-in-vitro>

[13] A. Troncoso, C. Matte, M. J. Venegas, y M. Cantos (1997) "Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid "in vitro". Andalucía, IRNAS (CSIC). Sevilla, pp. 457-463.

[14] H.B. Frost, R. K. Soost (1968) "Seed production: Development of gametes and embryos". En REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, H.J. (editores). *The Citrus Industry*. Vol. 2. University of

California, Berkeley, USA. pp. 290-324.

[15] P. White (1963) "The cultivation of plant and animal cells", 2° Ed. NY, Ronal Press Co. pp. 29,31, 41,43,217,246.

[16] Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - MGAP (2011) República Oriental del Uruguay "Protocolo a aplicar para el saneamiento de materiales de propagación de cítricos", pp. 16.

[17] H. Sturges (1926) "The choice of a class-interval", *Journal of the American Statistical Association*, 21(153), 65-66.

[18] P. Rojas (2001) "Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC)" Tesis M.Sc. Dpto. Ciencias Biol. y Agrop. Córdoba, Universidad Veracruzana, México.

[19] R. C. Paniagua (2004) "Adaptación de la técnica de Microinjertación in vitro de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y Citrumelo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.)", Tesis Btlgo. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología, pp. 32.

[20] J. J. Reynaga (2006) "Germinación en semilla de Chile como respuesta a la aplicación de productos orgánico -hormonales", Tesis de pregrado. Dpto. Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.

[21] M. Figueroa, G. Olivera, J. Torres, J. Van (2005) "Avances sobre el efecto del frío en la germinación de semillas de portainjertos cítricos". U.N. Tucumán, Argentina. En *Avances de la producción vegetal y animal en el NOA*, pp. 5.

[22] M. Vidal (2014) "Propagación in vitro de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) variedad Tahití a partir de segmentos nodales", Tesis de pregrado. Dpto. Ing. Agronómica. Zamorano-Honduras.

[23] F. Varela (2015) "Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México", Tesis M.Sc. Dpto. Producción Agrícola. U. Autónoma Nueva León, México.

[24] I. Pequeño, G. Martínez, V. Aguirre, L. Iracheta, V. Mojica, G. Rodríguez, M. Ojeda (2015) "Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* L. Bioagro". 27(3), 167-172.

[25] A. N. Ali, J. J. Muhammat, A. Haider, M. Qasim (2007) "In vitro studies on micrografting technique

in two cultivars of citrus to produce virus free plants”, Pak. J. Bot. 39(5), 1773-1778.

[26] Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT (1991) “Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones”, Roca, WM. Mroginski, LA. Cali, Colombia, pp. 970.

[27] M. J. Velasco (2013) “Anatomía y manejo agronómico de plantas injertadas en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)”, Tesis M.Sc. Dept. Horticultura. Universidad Autónoma de Shapingo. México.

[28] T. Mandel, H. Candela, U. Lamdau, L. Asis, E. Zelinger, C. C. Carles, L. E. Eshed (2016) “Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the ERECTA, CLAVATA and class III HD-ZIP pathways”. Company of Biologists Ltd. 143, 1612-1622

[29] R. Jonard, J. Hugard, J. Macheix, J. Martinez, L. Chancel, J. Poessel, P. Villemur (1983) “In vitro micrografting and its applications to fruit science”. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Scientia Horticulturae. 20, 147-159.

[30] M. Edriss, D. Burguer (1984) “Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three Trifoliolate rootstocks”, Scientia Horticulturae. 23, 255-259.

[31] S. Hernández (1996) “Obtención de plantas de cítricos libres de enfermedades transmisibles por injerto”, Serie Aqua. Costa Rica. 5(11), 7-9

[32] L. Navarro (1988) “Application of shoot-tip grafting in vitro Woody species. Vegetatie propagation Woody species”, Acta horticulturae. 227: 43-55.

[33] H. Hartmann, D. Kester, F. Davies, R. Geneve (2011) “Plant Propagation: Principles and Practices” 9° Ed. Prentice Hall, New York, pp. 464.

[34] M. Agusti (2003) “Citricultura”, 2° Edición, Mundi-Prensa, Libros, España, pp. 374-416.

[35] C. Morin, J. Bacula, R. Franciosi, R. Salas, A. San Martin, A. Puigros (1980) “Cultivo de cítricos”, 2° Edición. Perú. IICA (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas).

[36] L. Lluna (2006) “Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta” [Internet] Horticultura. Perú. [Citado 5 feb 2018]. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20general.pdf>

[37] J. Carvajal (1960) “Estudio de la deficiencia de nitrógeno, potasio, magnesio, boro y manganeso, en plantas de café (*Coffea arábica* var. *Typica*)”, Rev Biol.Trop. 8(2), 165-179.

[38] L. Lihua (2018) “Efecto de la sacarosa y

cotiledones sobre el prendimiento de microinjertos in vitro de naranja y limón (*Citrus* sp.)” Tesis Blgo. Fac. Ciencias, Biología. UNALM, Perú.