



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

PROGRAMA EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**CULTIVO *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS
TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA EN
CÍTRICOS: UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS INERTES**

MARÍA DE JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

M. F. ALTAMIRANO, VERACRUZ, MÉXICO

2007

La presente tesis titulada “**CULTIVO *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA EN CÍTRICOS: UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS INERTES**”, realizada por la alumna: **María de Jesús Martínez Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
PROGRAMA EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Alejandro Alonso López

ASESOR



Dr. Francisco Osorio Acosta

ASESOR



Dr. Felipe Gallardo López

ASESOR



Dr. Héctor López Moctezuma

ASESOR



Dr. Martín Mata Rosas

M. F. Altamirano, Veracruz, 11 de Diciembre 2007

CULTIVO *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA EN CÍTRICOS: UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS INERTES

RESUMEN

María de Jesús Martínez Hernández, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2007

La multiplicación de plantas *in vitro* presenta varias etapas críticas, desde la selección de los componentes para la germinación, multiplicación y enraizamiento hasta el proceso de aclimatación en invernadero. En la presente investigación se utilizaron los sustratos inertes (vermiculita, agrolita y tezontle) como medio de soporte en sustitución del agar y los azúcares xilosa, fructosa y 10X20F se compararon con la sacarosa, en su efecto sobre la germinación, multiplicación, enraizamiento y sobrevivencia de los portainjertos de cítricos: *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35. Además de probar diferentes intensidades luz en el proceso de aclimatación de plántulas de *Citrus volkameriana* con diferentes sustratos y una reducción gradual de la humedad relativa. Los porcentajes de germinación, multiplicación y enraizamiento fueron similares estadísticamente ($p > 0.05$), en todos los sustratos utilizados al igual que en el agar. La supervivencia fue superior estadísticamente ($p < 0.05$) en las plántulas obtenidas con sustratos inertes (91-100%) en relación a las que provenían de agar (48-51%). La respuesta de los azúcares xilosa, fructosa y 10X20F como sustitutos de la sacarosa, fue similar estadísticamente ($p > 0.05$) en la formación y altura de brotes, número de hojas por brote y número de raíces adventicias. Durante la aclimatación de *Citrus volkameriana* a 350 luz la sobrevivencia fue superior estadísticamente ($p < 0.05$) a las intensidades luminosas de 700 y 1050 luz. A 350 luz la supervivencia de las plantas obtenidas con vermiculita fue mayor estadísticamente (100%) en relación a las multiplicadas con agar (98%); los sustratos agrolita y suelo utilizados en la aclimatación no mostraron diferencias. Los resultados obtenidos con los sustratos inertes en la multiplicación *in vitro* de los portainjertos probados, indican su factibilidad para sustituirlos por el agar; además combinados con una baja intensidad luminosa y alta humedad relativa, incrementan la supervivencia de las plantas al pasar a invernadero.

Palabras Claves: Cultivo *in vitro*, Sustratos inertes, Cítricos

USE OF INERT SUBSTRATES FOR TISSUE CULTURE OF CITRUS ROOTSTOCKS TOLERANT TO CITRIC FRUIT SADNESS VIRUS

María de Jesús Martínez Hernández, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2007

ABSTRACT

Survival for *in vitro* plant production depends on the materials used for germination, multiplication, and rooting in the laboratory, as well as those selected for acclimatization in greenhouses. In this report, inert substrates such as Vermiculite®, Agrolite®, and Tezontle were tested as substitutes for agar in seed germination beds. The effects of sucrose, xylose, fructose, and 10X20F were tested as sucrose substitutes on the germination, multiplication, rooting and survival of explants of *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* and Citrage 35. The effect of different light intensities on *Citrus volkameriana* seedlings planted in different substrates at gradually reduced relative humidities also were tested. Germination, multiplication and rooting percentages were statistically similar across all substrates. Seedling survival was superior on inert substrates (91-100%) as compared to agar (48-51%). Use of xylose, fructose and 10X20F as sucrose substitutes promoted the same numbers, height and leaves per shoot, and numbers of adventitious roots. During acclimatization, survival of *Citrus volkameriana* seedlings was significantly greater at 350 lux as compared to 700 and 1050 lux. At 350 lux, seedling survival in Vermiculite® (100%) was greater than that in agar (98%). Agrolite® and soil showed similar survival results. The use of inert substrates as substitutes for agar in the production of *in vitro* explants is substantially improved. Further, plant survival in greenhouses can be increased by combining low light intensity with high relative humidity.

Key words: Tissue culture, inert substrates, Citrus

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Por el apoyo brindado para la realización de los estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Por haberme aceptado como estudiante y por su contribución en mi proceso de aprendizaje.

A la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana Zona Xalapa por todo el apoyo que me otorgaron durante mi formación.

A la Fundación Produce Veracruz. Por el apoyo brindado.

A los doctores Alejandro Alonso López, Francisco Osorio Acosta, Felipe Gallardo López, Martín Mata Rosas y Héctor López Moctezuma. Por formar parte de mi Comité Particular, por compartir su conocimiento, comprensión y regalarme su valioso tiempo durante el desarrollo de la investigación.

Al personal de apoyo y administrativo del Campus Veracruz: Porque con su labor permitieron realizar mis diversas gestiones de manera oportuna.

A todos mis maestros que contribuyeron e influyeron benigna y significativamente en el logro de mi capacitación y docta formación.

A mis amigos y compañeros de generación: Violeta, Karina, Verónica, Gabriela, Bromio, Elvis, Fritz, Héctor, José Luís y Julio por su valiosa amistad.

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida.

A MI MAMA ELVIRA

Quien me han apoyado e impulsado para seguir adelante; con quien he compartido alegrías, tristezas y ha soportado mis momentos difíciles.

A MI AMOR

Por ser la persona que dios me mandó para hacer de mí un ser lleno de felicidad y de amor. Te reitero mi profunda admiración, respeto y amor.

A MIS FAMILIARES

Por compartir su alegría y entusiasmo que siempre me han brindado.

In memoriam

A mi inolvidable abuelita

Gregoria Hernández Vazquez

**CULTIVO *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA
TRISTEZA EN CÍTRICOS: UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS INERTES.**

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN -----	iii
ABSTRACT -----	iv
AGRADECIMIENTOS -----	v
DEDICATORIA -----	vi
ÍNDICE DE CUADROS -----	x
ÍNDICE DE FIGURAS -----	xi
ABREVIATURAS -----	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN -----	1
CAPÍTULO II. MARCO CONCEPTUAL -----	3
2.1 Adopción del enfoque de sistema en la agricultura-----	4
2.2 Concepto de agroecosistemas-----	5
CAPÍTULO III. MARCO DE REFERENCIA -----	8
3.1 Antecedentes de producción de limón Persa -----	8
3.2 Portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos utilizados en limón Persa -----	9
3.3 Cultivo <i>In vitro</i> -----	10
3.4 Cultivo <i>In vitro</i> en cítricos -----	13
CAPÍTULO IV. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA Y PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN -----	16
4.1. Problema de investigación -----	18
CAPÍTULO V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS -----	19
5.1. Objetivo -----	19
5.2 Hipótesis -----	20

CAPÍTULO VI. ESQUEMA GENERAL METODOLÓGICO -----	21
CAPÍTULO VII. LITERATURA CITADA -----	24
CAPÍTULO VIII. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PATRONES DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA, EMPLEANDO SUBSTRATOS INERTES ALTERNATIVOS AL AGAR -----	31
8.1 Introducción -----	32
8.2 Materiales y métodos -----	33
8.3 Resultados y discusión-----	34
8.3.1 Germinación -----	34
8.3.2 Multiplicación -----	36
8.3.3 Enraizamiento -----	38
8.3.4 Supervivencia -----	39
8.4 Conclusiones -----	42
8.5 Literatura citada -----	43
CAPÍTULO IX. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS, EN LA MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA -----	48
9.1. Introducción -----	49
9.2 Materiales y métodos -----	50
9.3 Resultados y discusión-----	52
9.3.1 Multiplicación -----	52
9.3.2 Altura de los brotes y número de hojas -----	54
9.3.3 Brotes enraizados y número de raíces adventicias -----	56
9.4 Conclusiones -----	58
9.5 Literatura citada -----	59

CAPÍTULO X. ACLIMATACIÓN DEL PORTAINJERTO TOLERANTE AL VTC <i>Citrus volkameriana</i> MEDIANTE LA REGULACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ -----	64
10.1 Introducción -----	65
10.2 Materiales y métodos -----	66
10.3 Resultados y discusión -----	67
10.4 Conclusiones -----	71
10.5 Literatura citada -----	72
CAPÍTULO XI. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS -----	77
11.1 Contrastación de hipótesis-----	77
CAPÍTULO XII. CONCLUSIÓN GENERAL -----	80

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.	
Cuadro 1	Porcentajes de germinación, brotación y enraizamiento de los portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrumelo swingle</i> y C- 35.-----	36
Cuadro 2	Altura de los brotes, número de hojas y número de raíces por brote de los portainjertos de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrumelo swingle</i> y C- 35, con la presencia de diferentes azúcares-----	55
Cuadro 3	Porcentaje de supervivencia de <i>Citrus volkameriana</i> con 350, 700 y 1050 luz-----	67
Cuadro 4	Porcentaje de supervivencia de <i>Citrus volkameriana</i> con medios de soporte agar y vermiculita, sustratos agrolita y suelo-----	68

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Etapas Metodológicas de la investigación-----	23
Figura 2	Frecuencia en la formación de brotes de los portainjertos <i>C. volkameriana</i> , <i>C. swingle</i> y C- 35-----	38
Figura 3	Porcentaje de supervivencia de plantas en la etapa de aclimatación--	40
Figura 4	(a) Semillas de los portainjertos <i>C. volkameriana</i> , <i>C. swingle</i> y C- 35. (b) Sustratos inertes tezontle, vermiculita y agrolita. (c) Brote de <i>C. volkameriana</i> en medio de cultivo MS solidificado con agar. (d) brotes de <i>C. volkameriana</i> en medio de cultivo MS solidificado con sustrato inerte vermiculita-----	47
Figura 5	Porcentaje de brotes por explantes de los portainjertos <i>C. volkameriana</i> , <i>C. swingle</i> y C- 35 con diferentes azúcares en agar (a) y Vermiculita (b)-----	53
Figura 6	Porcentaje de brotes enraizados de <i>C. volkameriana</i> , <i>C. swingle</i> y C- 35, con diferentes azúcares-----	57
Figura 7	(a) Brote <i>C. volkameriana</i> en el medio de cultivo MS y la combinación de azúcar 10X20F solidificado con agar.(b) Medición de altura de brote C- 35 que proviene del medio de cultivo MS solidificado con agar. (c) Número de hojas del brote de <i>C. swingle</i> . (d) Brote enraizado de <i>C. volkameriana</i> en el medio de cultivo MS solidificado con agar.-----	63
Figura 8	Supervivencia de <i>Citrus volkameriana</i> durante el transplante en suelo y agrolita, con diferentes intensidades de luz-----	70
Figura 9.	(a) Modulo para la aclimatación de plantas de <i>C. volkameriana</i> con una intensidad de luz de 350. (b) Plántulas de <i>C. volkameriana</i> sembradas en agrolita que provienen de medio de cultivo MS, solidificado con agar. (c), plántulas de <i>C. volkameriana</i> sembradas en suelo, que provienen de medio MS, solidificado con vermiculita. (d) planta de <i>C. volkameriana</i> aclimatada a una intensidad de 350 luz ---	76

ABREVIATURAS

Acido clorhídrico	HCl
Ácido giberelico	AG ₃
Ácido-indolbutírico	AIB
Ácido α naftalenacético	ANA
Benciladenina	BA
Bióxido de carbono	CO ₂
Grados centígrado	°C
Gramo	g
Hidróxido de potasio	KOH
Litro	l
Miligramo	mg
Mililitro	ml
milímetro	mm
Normalidad	N
Porcentaje	%

I. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son considerados los frutales más importantes en el mundo, su cultivo y consumo se realiza por igual en los cinco continentes, siendo explotados en forma comercial. México ocupa el sexto lugar en producción, genera cerca de dos millones de jornales anuales durante el proceso de producción empaque y comercialización (FAO, 2002). Durante muchos años el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L. Osbeck) ha sido el portainjerto para cítricos más usado en el mundo. Actualmente su empleo está limitado debido al alto grado de susceptibilidad que presenta al Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC), cuando se injerta con especies de interés económico. Es importante señalar que el estado de Veracruz está en riesgo de perder 200 mil ha por el VTC, porque el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida* Kirkaldy), que es el vector más importante de este virus se ha detectado en diversos estados de la República Mexicana. Por lo que, es necesaria la propagación de portainjertos tolerantes, mediante técnicas de cultivo que garanticen la producción masiva de plantas libres de patógenos (Padrón, 2000; Murcia *et al.*, 2002). En este sentido se realizó la presente investigación: “Cultivo *in vitro* de portainjertos tolerantes al virus de la tristeza en cítricos: utilización de sustratos inertes,” la cual es una propuesta para la propagación masiva de plantas *in vitro*, teniendo como objetivo general estudiar el efecto de diferentes sustratos inertes y azúcares como sustitutos del agar y la sacarosa en los procesos morfogénicos *in vitro*. Durante la aclimatación se estudiaron los diferentes niveles de intensidad de luz en los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35 (C-35).

Este documento consta de doce capítulos principales; el presente intenta introducir al lector a través de la contextualización y justificación del objetivo general de la propuesta e incluyendo la descripción general del documento.

El segundo capítulo describe el enfoque de sistemas y el agroecosistema de manera general, analizando los procesos Agrícolas de forma sistémica.

En el tercer capítulo se describen los principales antecedentes del cultivo limón Persa contextualizándolo acorde a las características socioeconómicas, así mismo se revisan las principales características de los portainjertos y el cultivo *in vitro*. En el cuarto capítulo se aborda la situación problemática y el problema de investigación, dando origen al quinto capítulo donde de manera concreta se describen los objetivos y los supuestos de investigación.

En el sexto capítulo se describe el esquema general metodológico realizado para lograr los objetivos planteados.

En el capítulo ocho se describe el artículo “Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar”, el cual fue diseñado y operado para conocer el efecto de diferentes sustratos inertes como sustitutos del agar en la multiplicación y enraizamiento *in vitro*, así como la supervivencia de plántulas de los portainjertos: *C. volkameriana*, *C. swingle* y C-35.

En el capítulo nueve se describe el artículo “Efecto de diferentes fuentes de carbohidratos, en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza”, el propósito fue conocer el efecto de xilosa (X), fructosa (F) y la combinación de xilosa y fructosa (10X20F) en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes de *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35.

En el capítulo diez se describe el artículo: “Aclimatación del portainjerto tolerante al vtc *C. volkameriana* mediante la regulación de la intensidad de luz” fue diseñado y operado para conocer los diferentes niveles de intensidad de luz en la etapa de aclimatación de plántulas del portainjerto *C. volkameriana*.

Lo anterior da origen al capítulo once donde se presenta la contrastación de hipótesis establecidas acorde a los resultados obtenidos. En el doceavo capítulo se expone la conclusión general donde se observa en términos de síntesis los resultados de la presente investigación.

II. MARCO CONCEPTUAL

El soporte conceptual de este capítulo deriva fundamentalmente de la aplicación del enfoque de sistemas para analizar y transformar la agricultura; entendiendo los Agroecosistemas como la unidad donde se realiza.

Anteriormente la preocupación de la ciencia se había centrado casi exclusivamente en el estudio de las partes o secciones de los fenómenos naturales y sociales. Esta tendencia reduccionista logró avances considerables en el conocimiento y comprensión de estos fenómenos y en la solución de problemas de tipo tecnológico relacionados con ellos, pero cuando fue necesario estudiar fenómenos de orden social en cuyo comportamiento interaccionaban elementos de tipo económico, tecnológico y ecológico, el estudio disciplinario se vió limitado y no constituía una explicación conveniente de la dinámica de los problemas bajo estudio (Rubio y Yáñez, 2000).

Una forma de visualizar de manera integral esta problemática, es a través del enfoque de sistemas, la teoría de sistemas y sus principios. Entendiendo a los sistemas como un arreglo de los componentes físicos, conjunto o colección de cosas, unidas y relacionadas de tal manera que forman y actúan como una unidad o un todo, que responde de alguna manera a estímulos que lo alteren (Rubio y Yáñez, 2000).

Los elementos de un sistema pueden ser conceptos, en cuyo caso estamos tratando un sistema conceptual. Los elementos de un sistema pueden ser objetos, como por ejemplo, una maquina de escribir compuesta de varias partes. Los elementos de un sistema pueden ser sujetos, como los de un equipo de fútbol. Finalmente, un sistema puede estructurarse de conceptos, objetos y sujetos, como en un sistema hombre-maquina, que comprende las tres clases de elementos. Por tanto, un sistema es un arreglo de entidades, viviente no viviente, o ambas. Es suficiente visualizar que los sistemas se componen de otros sistemas a los que llamamos subsistemas. En la mayoría de los casos, podemos pensar en sistemas mas grandes

o superordinales, los cuales comprenden otros sistemas y que llamamos el sistema total y el sistema integral (Van Gigch, 2001). Así Hart (1985) define al sistema como un arreglo de componentes que funciona como una unidad.

2.1 Adopción del enfoque de sistema en la agricultura

La evolución de la investigación agrícola, en los últimos 50 años, ha demostrado la necesidad de utilizar el enfoque de sistemas como una herramienta útil que permite eficientar recursos (humanos, materiales y económicos). La adopción del enfoque de sistemas surge a partir de la necesidad de proporcionar marcos conceptuales que hicieran posible integrar el aporte de diversas ciencias y disciplinas para conocer y actuar en el desarrollo agrícola (González *et al.*, 1981). El enfoque de sistemas es un método de investigación, una forma de pensar, que enfatiza el sistema total, en vez de sistemas componentes, se esfuerza por optimizar la eficiencia del sistema total en lugar de mejorar la eficiencia de los sistemas cercanos (Van Gigch, 2001).

La adopción del enfoque de sistemas en la investigación agrícola se originó en la década de los setenta en países de agricultura avanzada como Australia, Inglaterra y Estados Unidos de América, se extendió a Holanda, Nueva Zelanda, Canadá, Suecia y Japón, posteriormente a países en desarrollo como India, y a partir de esta década a Argentina, Brasil, Uruguay y Chile principalmente. En la misma década centros regionales e internacionales de investigación agrícola lo adoptaron y lo promovieron como ejemplo el CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), etc. Actualmente sigue en expansión.

2.2 Concepto de agroecosistemas

El Agroecosistema es la entidad en cuya estructura se encuentra un componente socioeconómico (el productor y su familia) y otro productivo (la finca), éste último se sustenta en bases ecológicas (ecosistemas naturales), que por diseño y manejo del componente socioeconómico se convierte en entidades productivas, en las cuales reside el papel de proveer de alimentos y otros satisfactores a la sociedad actual y futura (Gallardo, 2004). Por lo tanto, un agroecosistema es un ente donde existen relaciones que interactúan en un espacio y tiempo dado, donde se encuentran componentes socioeconómicos y productivos que satisfacen las necesidades del ser humano a corto, mediano y largo plazo, que debe tener la capacidad de ser sustentable, manejado por el beneficiario (Martínez-Hernández, 2004).

Por otro lado, Ruiz (1995) consideró al agroecosistema como la unidad de estudio, bajo el enfoque agroecológico y sistémico, en sentido amplio de la agricultura, donde interactúan los aspectos ecológicos, socioeconómicos y tecnológicos.

Hart (1985) mencionó que un agroecosistema, es un ecosistema que cuenta por lo menos con una población de utilidad agrícola. Hay tres tipos de agroecosistemas, los que tienen un subsistema de cultivos (pueden ser anuales, perennes, árboles forestales, etc), los que tienen un subsistema de animales y los que tienen cultivos y animales.

Por otro lado, Sarabia (1985) señaló que un sistema agrícola deberá incluir los siguientes conceptos: un propósito, aquél por el cual el sistema es operado; una frontera, la cual define qué está dentro del sistema y qué queda fuera del mismo; el contexto, es decir, el ambiente externo en el cual funciona el sistema; los componentes, principales constituyentes que aparecen relacionados para formar el sistema, las interacciones, o sea, las relaciones entre los componentes; los recursos, componentes comprendidos en el sistema y que son utilizados para su

funcionamiento; los insumos o aportes, empleados por el sistema pero que tienen origen externo al mismo; los productos, el resultado esperado de la operación del sistema y los subproductos, productos útiles aunque obtenidos incidentalmente.

Debido a la alta complejidad de los agroecosistemas, para su análisis Conway y McCracken (1990), consideran la simplificación de un sistema ecológico modificado por el hombre para la producción de alimentos, fibras y otros productos agrícolas. Según estos autores, los agroecosistemas tienen propiedades que son: productividad, estabilidad, sostenibilidad y equidad. La productividad va a estar dada por la cantidad de alimento, combustible o fibra que un agroecosistema produce para el uso humano. La estabilidad se refiere a la consistencia de la producción y la sostenibilidad da el mantenimiento a niveles específicos de la producción a largo plazo. La equidad comparte la producción agrícola justamente. Marten (1988), a las propiedades planteadas por Conway y McCracken, agrega la autonomía como una autosuficiencia o independencia relativa de los factores externos del agroecosistema.

Las propiedades emergentes facilitan el análisis, entendimiento y funcionamiento del agroecosistema. El análisis debe considerar información cuantitativa y cualitativa que permite explicar productividad y eficacia del sistema pero también percepción y cosmovisión del productor (Pérez, 2003).

La productividad en el agroecosistema limón Persa se pone en riesgo, debido a la tristeza de los cítricos, ya que ésta enfermedad es considerada como la más destructiva en esta especie. Para lograr la estabilidad del agroecosistema es urgente tener el material de reemplazo (patrones tolerantes). Por otro lado, la sostenibilidad se debe dar a corto plazo, de manera planeada, considerando la velocidad de infestación del virus, dadas las condiciones favorables que se presentan para su dispersión, esto conlleva a tener plantas suficientes para la oportuna sustitución del naranjo agrio (*Citrus aurantium*) por los portainjertos tolerantes más utilizados en las zonas cítricas (*Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35).

El sistema de producción de limón Persa requiere de gran cantidad de entradas (insumos), para su producción intensiva con calidad de exportación. La propagación tradicional nos permite obtener de una semilla una planta, si utilizamos la alternativa tecnológica de cultivos de tejidos, podemos producir mas plantas a partir de una semilla, esta va encaminada a obtener la autonomía del agroecosistema limón Persa.

Por otro lado, el cultivo *in vitro* se puede contextualizar como un sistema que tiene componentes, interacción entre componentes, entradas, salidas y límites. Los componentes del medio de cultivo son los macronutrientes, micronutrientes, carbohidratos, reguladores del crecimiento, vitaminas, agua destilada y como medio de soporte agar. También se pueden considerar como componentes a las semillas o partes de la planta (explantes) que se desea propagar. La interacción de los componentes del medio de cultivo da como resultado que sea un medio nutritivo que proporcione a las semillas o explantes energía para su germinación y su multiplicación. Las entradas lo conforman todo los componentes y las salidas se consideran a las plántulas que resultaron de la germinación y multiplicación. Los límites lo conforman las paredes del frasco de 120 ml.

III. MARCO DE REFERENCIA

En este capítulo se describen y analizan los antecedentes del sistema de producción limón Persa, los portainjertos utilizados y el cultivo *in vitro* que permitieron contextualizar esta investigación.

3.1. Antecedentes de producción del limón Persa

Históricamente el limón Persa comenzó a desarrollarse comercialmente en los Estados Unidos, siendo en términos relativos un producto de nula participación dentro de la producción de limones de México. Ésto cambió y originó un auge por la demanda de diversas variedades de limones para usos industriales, aunado a la destrucción de las zonas productoras de limón Persa en Norteamérica, además de la reorientación de cultivos que se realizó en la zona, por lo que a partir de la década de los ochenta, surgió un mercado para el limón Persa producido en México (Gómez *et al.*, 1994). El auge del comercio mundial de limones se ha orientado a cubrir el mercado norteamericano, que es uno de los mercados más dinámicos e importantes a nivel mundial. Los volúmenes exportados a ese país se incrementaron aceleradamente, ante una demanda que creció más rápido que la producción nacional (FAO, 2000).

El municipio de Martínez de la Torre posee la mayor superficie de este cultivo, encontrándose huertos también en Gutiérrez Zamora, Papantla, Tecolutla, Tlapacoyan y Misantla. En la parte central y sur de la entidad, entre los municipios de reciente incursión en el cultivo, se encuentran Rodríguez Clara, Acayucan, Uxpanapa, Cuitláhuac, Carrillo Puerto y las Choapas (Alarcón *et al.*, 1992; Curti-Díaz *et al.*, 1993; Curti-Díaz *et al.*, 1996). Sin embargo, el cultivo del limón enfrenta múltiples problemas de productividad por la falta de créditos, falta de impulso a la investigación y transferencia de tecnología, e introducción de sistemas de riego, y por falta de una eficiente organización de productores. Así como la presencia del virus de la tristeza de los cítricos (VTC).

3.2 Portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos utilizados en limón Persa

La aparición de brotes epidémicos causados por el VTC en todo el mundo, ha ocasionado la substitución del naranjo agrio como portainjerto en el restablecimiento de la citricultura en la zona afectada, por portainjertos que se comportan como tolerantes a la tristeza. El término “tolerante” se refiere a la capacidad de los árboles injertados a resistir la infección por el VTC, sin manifestar los síntomas de declinamiento y/o muerte por efecto de la enfermedad (Bar-joseph *et al.*, 1989). El empleo de portainjertos tolerantes como alternativa para reducir daños por tristeza va dirigida principalmente a contrarrestar el efecto de la enfermedad; lo anterior significa que los patrones de referencia pueden prosperar aun en presencia de la enfermedad.

Es conveniente tener presente que existen razas extremadamente severas de VTC (Lee *et al.*, 1992), cuando éstos aislamientos se presentan ocasionan acanalamiento o picado de ramas y/o tallos, afectando al cultivo; aun en aquellos portainjertos que se comportan como tolerantes al declinamiento y/o muerte causado por el VTC (Padrón, 2000). Por otra parte, los portainjertos tolerantes al estar infectados por el virus, pueden actuar como reservorios de la enfermedad para otras plantaciones. A continuación se describen brevemente las características generales de los portainjertos de los cítricos reportados como tolerantes a la tristeza, que son frecuentemente utilizados en limón Persa.

Citrus volkameriana Pascuales, es un portainjerto considerado como tolerante a tristeza, exocortis y psorosis; recientemente se ha comprobado su sensibilidad a cachexia/xiloporosis en Brasil. Se utiliza en Italia como patrón de limonero por tener una mayor resistencia al “mal seco”, comparado con el naranjo agrio. Presenta buena resistencia a la caliza, además una moderada resistencia a la salinidad y a *Phytophthora sp*; pero es sensible al frío. Su comportamiento en vivero es bueno, aunque da lugar a cierta heterogeneidad de plantas. El trasplante hay que efectuarlo con precauciones, ya que es un patrón que se encuentra casi permanentemente en

actividad vegetativa; además, las raíces finas laterales son muy frágiles y se rompen con facilidad al arrancar la planta. Como patrón de naranjo y limones, induce una excelente producción, aunque la calidad de la fruta es inferior a la de otros patrones (Forner-Valero, 1985).

Citrumelo swingle CPB.4475, este híbrido fue obtenido en 1907 por W.S.Swingle, En Eustis, Fla. (Medina-Urrutia y Valdez –Verduzco, 1990). Además es resistente a exocortis, cachexia, xiloporosis, a la caliza y presenta una resistencia media a la salinidad. Sin embargo, es muy sensible a *Phytophthora sp.*, altamente sensible a la asfixia radical y al frió. Por otro lado, es un patrón aceptado para limón Persa en suelos ácidos (Campbell, 1991).

Citrange 35 (C-35), este portainjerto fue obtenido en 1909, por E.M.Saye en Riverside, Ca. Polinizando flores de Washington navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck) con polen de *Poncirus trifoliata* (L). Raf., siendo en la actualidad muy utilizado (Forner-Valero, 1981). Es tolerante a psorosis, cachexia, xiloporosis; resistente a *Phytophthora sp.* pero sensible a exocortis y a los contenidos altos de calcio en el suelo, a la salinidad y tolera poco la sequía (Forner-Valero, 1985).

3.3 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica útil en estudios básicos, en la propagación de especies económicamente importantes, también se utiliza en estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y morfológicos (McCown y Séller, 1987; Pierik, 1990). Diversos factores deben ser considerados para tener éxito en la aplicación de esta técnica, la especie y los componentes necesarios en el medio nutritivo, como sales minerales, reguladores de crecimiento, fuente de carbono, soportes y vitaminas, deben proporcionarse en cantidades adecuadas para asegurar la multiplicación y diferenciación celular. Además de los factores que influyen en el crecimiento en un microambiente artificial, como espacio limitado, competencia por luz, CO₂, O₂, etc., la concentración de los componentes del medio se pueden adecuar dependiendo del

objetivo de la investigación (Fiore *et al.*, 2002; Wu y Money, 2002; Chiari y Bridgen, 2002).

Los diversos medios empleados para cítricos se han solidificado con 5 a 7 g l⁻¹ de agar; las marcas más utilizadas son: bioxón, Merck y el fitoagar de Sigma. Debido al costo tan elevado de este producto se han realizado estudios para sustituirlo, entre los que se han probado el gel-rite, grenetina e incluso se ha llegado a utilizar medio líquido, lo cual hace que se abaraten los costos y tenga diversas aplicaciones. La elección entre un medio líquido o uno sólido se ha hecho en forma arbitraria y depende en gran medida de la especie y la etapa de cultivo (Bonga, 1982). En durazno, los tejidos son establecidos más fácilmente usando medio líquido con soporte de papel (Zimmerman, 1983). El medio líquido ha permitido realizar estudios nutrimentales, en los cuales se determinó que la absorción de calcio en vid inició después de 21 días de cultivo a una concentración de 3.75 a 5 mM, niveles más altos influyen en desordenes fisiológicos como la vitrificación (Arellano, 1994). La vitrificación es la formación de órganos con apariencia cristalina y engrosada, con un alto contenido de agua, también llamada transformación hiperhídrica (Ghashgaire *et al.*, 1991).

Leshem (1983) menciona que la concentración del agar influye en la rigidez del gel, lo que puede inducir vitrificación en los brotes afectando la tasa de propagación y el potencial mátrico del medio de cultivo.

Ghashgaire *et al.* (1991), establecen que el grado de rigidez del agente gelificante afecta significativamente el número de yemas adventicias por explante de *Picea abies*. Por otro lado, en experimentos en clavel y rosal con gradientes de agar de 0 a 16 g l⁻¹, indican que al incrementar el estado acuoso del medio, al disminuir la concentración de agar, se promueve mayor proliferación debido a una mayor disponibilidad de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. Sin embargo, los niveles bajos de agar ocasionaron la formación de tejidos vitrificados.

Singa *et al.* (1990) obtuvieron buen desarrollo de brotes de membrillo (*Cydonia oblonga* Mill) iniciados en el medio de Murashige y Skoog (MS), con 5 μM de Bencil adenina (BA) y 6 g l^{-1} de agar. Cuando la concentración de agar se incrementó a 12 g l^{-1} obtuvieron el 83% de brotes vitrificados y el 87% presentaron necrosis apical combinado con concentraciones bajas de calcio (3 mM en el medio) en comparación con 9 y 18 mM.

Clarkson (1985) al trabajar con piña utilizando diferentes concentraciones de agar (4, 5, 6, 7 y 8 g l^{-1}), encontró que la menor concentración es la que induce la mayor multiplicación de brotes; así mismo, observó que existe un notorio efecto del agar en presencia de (BA).

Otro de los componentes del medio de cultivo es el azúcar, como es bien sabido es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*; se han utilizado diversos tipos de azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa y galactosa) a diferentes concentraciones 15-50 g l^{-1} , dependiendo del tipo y edad del material vegetal (McCown y Séller, 1987).

La sacarosa es la más usada en los medios de cultivo, es de origen orgánico y es la fuente principal de carbono y energía en los órganos y tejidos cultivados *in vitro*, además tiene un papel osmoregulador, siendo esencial para la formación de raíces (Fujiwara *et al.*, 1988)

Las condiciones de regímenes de cultivo (autótrofo, heterótrofas y mixótrofas) durante la proliferación *in vitro* de fresa favorecen el crecimiento y desarrollo de los brotes, cuando se cultivaron en medio sin sacarosa, con baja concentración de CO_2 existente en el ambiente del cultivo (Fujiwara *et al.*, 1988). Esto concuerda con Kosai *et al.* (1991) quienes mencionan que con la utilización de recipientes con ciertos niveles de intercambio gaseoso durante la multiplicación *in vitro*, se puede disminuir la concentración tanto de sales minerales como de sacarosa para obtener mejores

resultados, e incluso disminuir la aparición de desordenes fisiológicos como la vitrificación.

3.4 Cultivo *in vitro* en cítricos

Los primeros trabajos de micropropagación en cítricos con diferentes partes de la planta fueron realizados por Grinblant en 1972. Los mejores resultados se obtuvieron con tejido nucelar y embriones en el medio de cultivo Sachs. De igual forma, en otros estudios de morfogénesis utilizando flores, frutos y semillas de cítricos se desarrollaron en el medio de White. El mismo autor señaló la posibilidad de formación de yemas por arriba de la callosidad originada de esquejes de cítricos, por la presencia de altas concentraciones de benciladenina (BA) 10 mg l^{-1} en los tratamientos. Además, existe la posibilidad de favorecer la división celular con la BA y el α -naftalenacético (ANA) a concentraciones de 1.0 y 0.1 mg l^{-1} respectivamente, también en algunos casos inhibe la formación de productos que pueden aumentar la senescencia de los tejidos, los cuales se tornan de color café y mueren. Por otro lado se puede mencionar que en el caso de tejidos, el balance entre auxina y citocininas influye en la organogénesis. A partir de estos intentos, los avances posteriores en el desarrollo de un sistema de micropropagación para *Citrus* han tenido como base el resultado de éstas observaciones. Desde entonces la micropropagación de cítricos ha desempeñado un papel importante en la investigación asociada a la propagación, proveyendo un método más, sin reemplazar las investigaciones anteriormente realizadas sobre técnicas convencionales de propagar plantas (Simões *et al.*, 1990; Zimmerman, 1995).

Diversas especies de *Citrus*, *Poncirus* y cruzas intergenéticas han sido regeneradas *in vitro* con embriones inmaduros, órganos reproductivos como óvulos fecundados y no fecundados; callos somáticos originados de hojas y segmentos de tallo; las cuales han demandado niveles específicos de nutrimentos, reguladores de crecimiento y demás componentes del medio de cultivo, de acuerdo al tipo de explante utilizado (Morin, 1986).

Rodríguez (1986) al propagar *in vitro* limón mexicano con y sin espinas, utilizó diferentes tipos de explantes; yema nodal, escudete, completa y desnuda, nombres que desde el punto de vista anatómico son difíciles de entender. El mejor resultado para número y tamaño de brotes lo obtuvo con yema nodal para ambos materiales. En cuanto a las concentraciones de BA, la mejor respuesta para la etapa de establecimiento es de 0.4 a 0.6 mg l⁻¹. Así mismo, observó el efecto de la posición de las yemas para las variables antes mencionadas y obtuvo la mejor respuesta para aquellas que están en las posiciones 7, 8 y 9 en sentido basipétalo.

Rodríguez-De la O *et al.* (1999) establecieron el cultivo de meristemas de raíz de cítricos, con una longitud de 500 micras, en un medio líquido MS suplementado con 1.0 mg l⁻¹ de piridoxina HCl, 1.0 mg l⁻¹ de ácido nicotínico, 100 mg l⁻¹ de mioinositol, 1.0 mg l⁻¹ de tiamina HCl y 50 g de sacarosa, el mayor crecimiento fue para el cv “Eureka” y el híbrido interespecífico “*Citrange troyer*”, los cuales desarrollaron a los 20 y 60 días una longitud de 5 y 30 mm, respectivamente.

Singh *et al.* (1994) utilizando brotes jóvenes como explantes de *C. reticulata* y *C. limón*, encontraron el máximo número y tamaño de brotes para ambas especies con el medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con BA 1.0 mg l⁻¹, cinetina 0.5 mg l⁻¹, ANA 0.5 mg l⁻¹ y 0.1 mg l⁻¹ de ácido-indol butírico (AIB). Por otro lado, Clarkson (1985) utilizó como explantes fragmentos de hoja, epicotilos y cotiledones del híbrido *C. nobilis* Lour. x *C. deliciosa* Tenora; los que micropropagó en el medio MS, obtuvo la mayor cantidad de embriones somáticos con los cotiledones y epicotilos en combinación con 0.5 mg l⁻¹ de BA y 1.0 mg l⁻¹ de ANA en el medio. Mientras que la mayor regeneración de plantas se presentó cuando utilizó fragmentos de hojas y cotiledones en combinación con 3.0 de BA y 0.5 mg l⁻¹ de ANA. En cuanto a la inducción de raíces *in vitro*, el mejor tratamiento fue la combinación de 0.5 mg l⁻¹ de ANA y 1.0 mg l⁻¹ AIB, independientemente del explante utilizado.

Moore (1986) estudiando el comportamiento de tres portainjertos de cítricos: naranjo agrio, mandarina "*Cleopatra*" y "Citrange *carrizo*" y utilizando secciones de tallo como explante, obtuvo el mayor número y tamaño de brotes con 22.0 μM de BA conjuntamente con 5.4 μM de ANA. Además cuando utilizó diferentes concentraciones de BA, AIB y ácido giberélico (AG_3) y como explantes fragmentos nodales e internodales de *Maclura pomifera*, observó que existe una mejor respuesta de los explantes nodales.

IV. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA Y PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Este apartado tiene como intención exponer de forma sintética la problemática en que se encuentra la citricultura en el estado de Veracruz, lo cual permite exponer el problema de investigación.

Durante muchos años el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L Osbeck.) ha sido el portainjerto para cítricos mas usado en el mundo. Actualmente su empleo está limitado cuando se injerta con especies de interés económico, ésta combinación presenta un alto grado de susceptibilidad al Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC). El Estado de Veracruz actualmente está en riesgo de perder 200 mil ha por el VTC, ya que la presencia del pulgón café *Toxoptera citricida* Kirkaldy vector del Virus de la Tristeza fue detectado en plantaciones de Nautla, Vega de Alatorre y Misantla (SAGARPA, 2005). Este virus puede provocar un caos económico y social en todas las zonas cítricas del estado de Veracruz, debido a que los cítricos generan alrededor de 32 mil empleos directos y 97 mil indirectos en la industrialización y comercialización de sus productos, con una derrama económica de 3 mil 832 millones de pesos (FAO, 2006). Es importante señalar que en México, la reconversión se da de manera paulatina en las plantaciones que se encuentran injertadas con naranjo agrio, evitando pérdidas económicas y la destrucción de las zonas cítricas.

En este sentido, es necesaria la propagación de portainjertos tolerantes, mediante técnicas de cultivo que garanticen la producción de plantas libres de patógenos. El cultivo de tejidos es una herramienta de gran utilidad en la biotecnología; esta técnica se basa en la "totipotencialidad celular", capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas dadas en el cultivo *in vitro* (Nacheva *et al.*, 2002). Los medios para el cultivo *in vitro* generalmente contienen macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, una fuente de carbohidratos, ácidos orgánicos y otros compuestos. Además, se utiliza un soporte para los explantes, éste puede ser el agar, papel fito u otros (Rodríguez-De la O *et al.*, 1999; Nowak *et al.*, 2004). A la fecha existen medios de cultivos generados

para diversas especies de árboles frutales, la respuesta de estas especies ha sido variable y se ha tratado de explicar con base al efecto principalmente de los componentes del medio de cultivo como son macronutrientes, micronutrientes, reguladores del crecimiento y vitaminas, no considerando el efecto del agar ni la fuente de carbono. Si bien es cierto que los componentes del medio son fundamentales para la micropropagación, también lo es la capacidad de supervivencia de plantas al pasar del cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*, en invernadero o sombreaderos (Preece y Sutter, 1991).

Las plántulas *in vitro* se desarrollan en recipientes con una alta humedad relativa, en condiciones asépticas y un medio de cultivo que les proporciona los nutrientes y carbohidratos necesarios para un crecimiento heterotrófico o mixotrófico, de forma que las plantas cultivadas *in vitro* tienen una capacidad fotosintética muy pobre. Todo esto contribuye a que estas plantas carezcan de las condiciones anatómicas y fisiológicas necesarias para sobrevivir si se les coloca directamente en el exterior. Las hojas que se forman *in vitro* no están adaptadas a las condiciones de invernadero, normalmente es necesario suministrar a las plántulas condiciones lo más próximas posible al ambiente en el que se encontraban *in vitro* cuando se les expone por primera vez al ambiente exterior (Kosai *et al.*, 1991). De esta forma, la mayoría de las especies multiplicadas *in vitro* requieren de ser sometidas a un proceso de aclimatación gradual hasta que desarrollen nuevas hojas, más adaptadas a las condiciones bajo las cuales se desarrollan las plantas normalmente. Las plantas que no se aclimatan adecuadamente muestran síntomas de estrés como marchitamiento, necrosis en los bordes o puntas de las hojas y muerte de plantas (Hazarika, 2003).

Por lo antes mencionado existe la necesidad de estudiar otro tipo de sustratos que permitan servir como soporte y que sean accesibles de usar en el medio de cultivo, para lograr identificar y profundizar el conocimiento de los factores de multiplicación, enraizamiento *in vitro*. Así mismo técnicas que incidan en una alta supervivencia de plantas bajo condiciones *ex vitro*.

4.1. Problema de investigación

¿Cuál es la multiplicación, enraizamiento y supervivencia de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y *Citrango 35* cultivados *in vitro* utilizando agar, agrolita, vermiculita y tezontle?

¿Cuál es la multiplicación y enraizamiento de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y *Citrango 35* cultivados *in vitro* utilizando los azúcares xilosa, fructosa y la combinación xilosa y fructosa (10X20F)?

¿Cuál es el efecto de la intensidad de luz (350, 700 y 1050) sobre la supervivencia del portainjerto *Citrus volkameriana* cultivado *in vitro* con agar y vermiculita?

V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En este apartado se expone los objetivos e hipótesis planteados, los cuales corresponden al problema de investigación.

5.1 Objetivos

1. Conocer el efecto de diferentes sustratos inertes como sustitutos del agar en la multiplicación y enraizamiento *in vitro*, así como la supervivencia de plántulas de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35.

2. Evaluar el efecto de xilosa (X), fructosa (F) y la combinación de xilosa y fructosa (10X20F) en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35.

3. Evaluar diferentes niveles de intensidad de luz durante la etapa de aclimatación de plántulas del portainjerto *Citrus volkameriana*.

5.2 Hipótesis

1. La multiplicación, enraizamiento y supervivencia de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange- 35 cultivados *in vitro* utilizando agar, agrolita, vermiculita y tezontle son diferentes.

2. La multiplicación y enraizamiento de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange- 35 cultivados *in vitro* empleando los azúcares xilosa, fructosa y la combinación xilosa y fructosa (10X20F) son diferentes.

3. La supervivencia del portainjerto *Citrus volkameriana* cultivado *in vitro* con agar y vermiculita es diferente a intensidades de 350, 700 y 1050 luz durante la aclimatación.

VI. ESQUEMA GENERAL METODOLÓGICO

El presente capítulo tiene como propósito describir el proceso metodológico general de la investigación que se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, ubicado en la comunidad de Tepetates, perteneciente al municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, en el kilómetro 26.5 de la carretera Veracruz-Xalapa, con una latitud Norte 19°16' y longitud Oeste 96°16', a una altitud de 20 msnm. Durante el periodo noviembre de 2004 a diciembre de 2006.

En la Figura 1, se indican las tres fases metodológicas que se realizaron en la investigación, las cuales corresponden a cada uno de los objetivos planteados. Estas fases se describen con mayor detalle en los capítulos VIII, IX y X.

En la primera fase se comparó la respuesta de los sustratos inertes agrolita, vermiculita y tezontle con el agar en la germinación, multiplicación y enraizamiento *in vitro*. Una vez enraizadas los brotes se transplantaron para evaluar la supervivencia durante la aclimatación.

La segunda fase, se evaluó el efecto de xilosa (X), fructosa (F) y la combinación de xilosa y fructosa (10X20F) en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35, para lo cual se seleccionó el sustrato inerte vermiculita como medio de soporte en el medio de cultivo, comparándolo con el medio de cultivo que solidificó con agar, además al medio de cultivo se le adicionó como fuente de carbohidratos xilosa, fructosa y 10X20F, comparados con sacarosa en la multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

En la tercera y última etapa se utilizó agar y el sustrato inerte vermiculita para solidificar el medio de cultivo, durante la multiplicación y enraizamiento *in vitro* del portainjerto *Citrus volkameriana*. Para la etapa de aclimatación, los brotes enraizados se trasplantaron en dos sustratos (agrolita y una mezcla de suelo) y se probaron diferentes niveles de intensidad de luz (350, 700 y 1050); además, en todos los tratamientos se aplicó una reducción gradual de la humedad relativa (100, 75 y 50%).

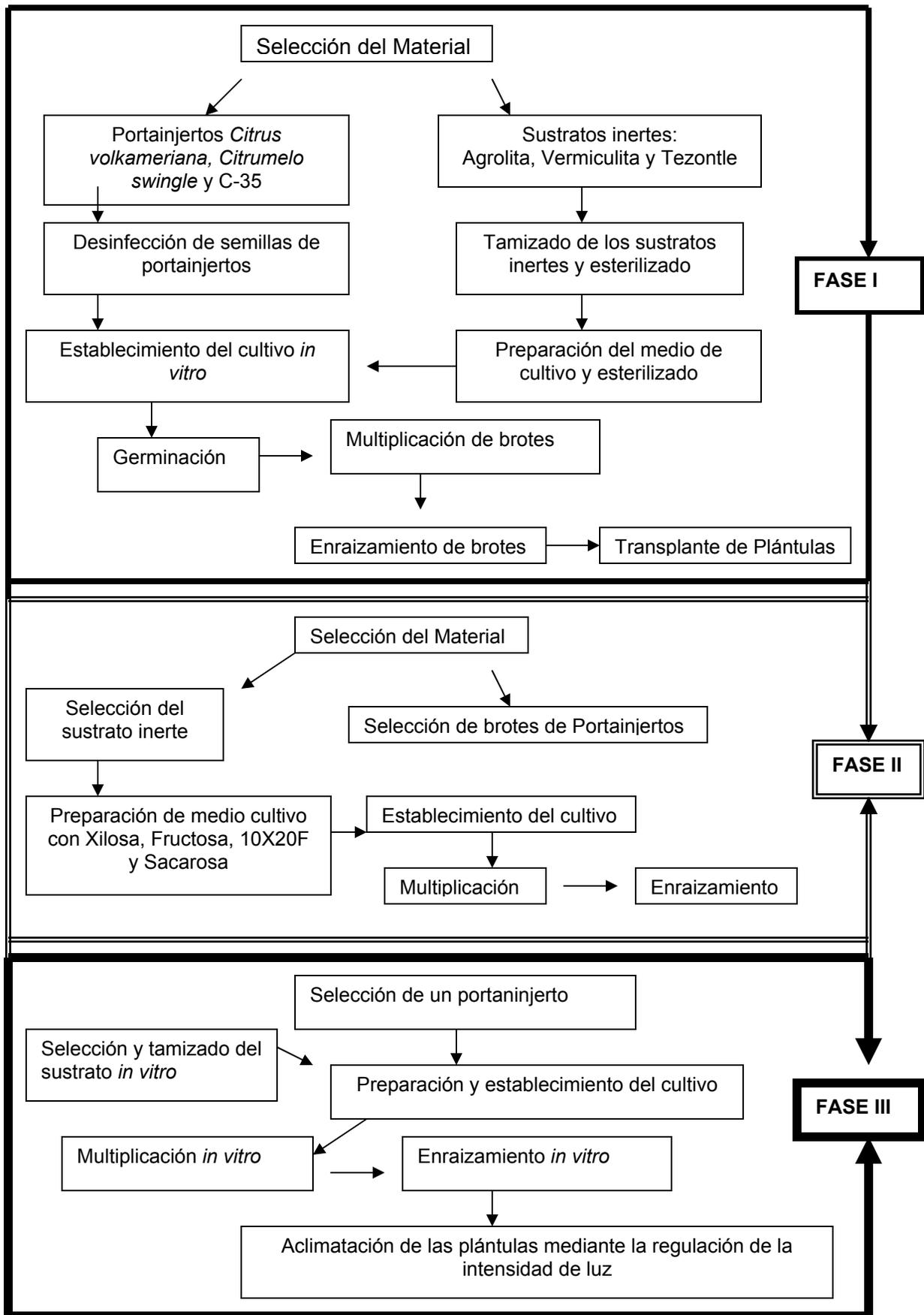


Figura 1. Etapas Metodológicas de la investigación

VII. LITERATURA CITADA

- Alarcón, V.C; F.M. Corro; A.G. Morales; J.A.M Rosario. 1992. Diagnóstico del cultivo de limón Persa (*Citrus latifolia*), en la región de Cuitláhuac, Ver. Tesis Profesional. UDICBAC. Universidad Veracruzana. Córdoba, Ver. 63 p.
- Arellano, O.G. 1994. Absorción de calico durante la proliferación *in vitro* de vid cv. Málaga Blanca. Tesis de Maestría. Programa de Fruticultura Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Bar-Joseph, M; R. Marcus; R.F. Lee. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Annual Review Phytopathology. 27: 292-316.
- Bonga, J.M. 1982. Cell and tissue culture techniques. In: Tissue culture in forestry. J.M. Bonga; D.J. Duzan. (eds.) Martinus Nijhoff/ Dr. W.Junk Publishers Printed in Netherlands. pp. 4 -35.
- Campbell, C.W. 1991. Rootstocks for "Tahiti" Lime. Proc. Fla. State Hort. Soc.104:28-30.
- Conway, G.R; A. McCracken. 1990. Rapid rural appraisal and agroecosystem analysis. In: Agroecology and small farm development. M.A Altieri; S.B. Hecht. (eds.). CRC. Press. USA. pp. 221-234.
- Curti-Díaz, S.A; M.S. Orozco; U.Z. Díaz; S.X. Loredó; R.M. Rodríguez; R.A Parra; J.A. Sandoval 1993. Manual de producción de los cítricos en Veracruz. Folleto para productores No.5. SARH-INIFAP-CIRGOC. Campo Experimental Papantla. Papantla, Ver. México. 74 p.

- Curti-Díaz, S.A; S.X. Loredó; U. Díaz-Zorrilla; J.A. Sandoval; H. Hernández. 1996. Manual de producción de limón Persa. Folleto Técnico No.14 Campo Experimental Ixtacuaco. SARH. INIFAP. CIRGOC. Martínez de la Torre, Ver., 45 p.
- Clarkson, T.D. 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Annual Review Plantarum Physiology 36:77-115.
- Chiari, A; M.P. Bridgen. 2002. Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 68:49:55
- FAO. 2000. Base de datos de FAOSTAT. Food and agriculture organization. <http://www.apps.fao.org>. Consultado el 20 de febrero de 2004.
- FAO. 2002. Base de datos de FAOSTAT. Food and agriculture organization. <http://www.apps.fao.org>. Consultado el 25 de marzo de 2005.
- FAO. 2006. Base de datos de FAOSTAT. Food and agriculture organization. <http://www.apps.fao.org>. Consultado el 10 de febrero de 2007.
- Fiore, S.F; Da Pasquale; F. Carimi; M. Sajeve. 2002. Effect of 2, 4-D and 4- CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style thin cell layers of citrus. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 68:57-63
- Fornier-Valero, J.B. 1981. Combinaciones injerto patrón en cítricos. Jornadas Cítricas Andaluzas. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Estructuras y Producción Agraria. Sevilla. pp. 41-56.

- Forner-Valero, J.B. 1985. Características de los patrones de agrio tolerantes a tristeza. Jornadas Citrícolas Andaluzas. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Estructuras y Producción Agraria. Sevilla, España. 20 p.
- Fujiwara, K; T. Kozai; I. Watanabe. 1988. Development of a photoautotrophic tissue cultura system for shorts and or planlets at rooting and acclimatization stages. Acta Horticulturae 230:53-158.
- Gallardo, L.F. 2004. El Concepto de agroecosistemas. Notas para el curso de introducciónal estudio de los Agroecosistemas tropicales. Colegio de Postgraduados. 15 p.
- Ghashghaie, J; F. Brenckmann; B. Saugier. 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultures *in vitro*. Physiol. Plant. 82:73-78.
- Gómez, C.M; R.R. Schwentesius; G. A. Barrera. 1994. El limón Persa en México. Una opción para el trópico.SARH. CIESTAAM. UACH. 202 p.
- Gonzáles, M.J; G.A. Pérez; D.F.León; L.H. Calderón; S.A. Astori; T.S. Figueroa. 1981. La planificación del desarrollo agropecuario. Vol. I.Texto del Instituto Latinoamericano de Planificación Económica y Social. Siglo XXI Editores, 3ª Edición. México. 220 p.
- Grinblant, U. 1972. Differentiation of citrus ítem *in vitro*. Journal of the American Society for Horticulturae Science 97: 599-603.
- Hart, R.D. 1985. Conceptos básicos sobre agroecosistemas. Series materiales de enseñanza No. 1. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 159 p.

- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85 (12):1704-1712.
- Kosai, T; k. Iwabuchi; K. Watanabe. 1991. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.225:107-115.
- Lee, R.C; C.Niblett; R. Lastra; M. Rocha; S. Garnsey; R. Yokomi; R. Gumpf; J. Dobbs. 1992. Presence of *Toxoptera citricidus* in Central America. *Citricidus Industry Magazine* 73(6):13-63.
- Leshem, B; D.P. Shaley; S. Izahar. 1988. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Annual of Botany*. 61:255-260.
- Marten, G.G. 1988. Productivity, stability, sustainability, equitability and autonomy as properties for agroecosystem assessment. *Agricultural Systems* 26:291-316. USA.
- Martínez-Hernández, M.D.J. 2004. Concepto de agroecosistema. Notas para el curso de introducción al estudio de los agroecosistemas tropicales. Colegio de Postgraduados. 10 p.
- McCown, B.H; J. Sellmer. 1987. General principles and biotechnology. In: Cell and tissue culture in forestry. Bonga J. M; Durzan. Martinus Nijhoff/ Dr. W.Junk Publishers Printed in Netherlands. pp 4 -35.
- Medina-Urrutia, V.M; J. Valdez-Verduzco 1990. Crecimiento y producción de limón Bears (*Citrus latifolia* Tanaka) sobre ocho portainjertos en dos condiciones de suelo. XIII Congreso Nacional de Fitogenética. 167 p.

- Moore, G.A. 1986 *In vitro* propagation of citrus rootstocks. Horticulturae Science 21:300-3001.
- Morin, C.1986. Cultivo de cítricos, segunda edición, IICA. Lima Perú. 45 p.
- Murashige, T; F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid grow and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15: 473-497.
- Murcia, R.N; A.J.Osorio; A. Caicedo; L. Calvert; F. Morales. 2002. Distribución y caracterización serológicas de aislamiento del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. 70.p
- Nacheva, L; K. Ivanova; P. Manolov; Z. Zlatev. 2002. Possibilities for application of photoautotrophy in micropropagation of Dzhanka 4 (*Prunus cerasifera* Ehrt.) rootstock. Acta Horticulturae. 577:199-2005.
- Nowak, B; K. Miczynski; L. Hudy. 2004. Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of Wegierka Zwyczajna plum (*Prunus domestica*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 76:255-260.
- Padrón, J.E. 2000. Precauciones y uso de patrones cítricos tolerantes a tristeza. Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C.P. pp.36-43.
- Pérez, V.A. 2003. El Concepto de agroecosistemas: definiciones y enfoque. Notas para el curso de introducción al estudio de los agroecosistemas tropicales. Colegio de Postgraduados. 25 p.
- Pierik, R.L.M. 1990. Preparación y composición del medio de cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ª. Ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 45-86.

- Preece, J.E; E.G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In*: Micropropagation technology and application. P.C. Debergh; Zimmerman R.H. (eds.) Kluweracademic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. pp. 71-93.
- Rodríguez- De la O, L.J; V.M. Villalobos-Arámbula; H.S. Azpiroz-Rivero; R. Villalobos-Pietrini. 1999. Effect of malt extract and ammonium nitrate on *in vitro* cultures to obtain somatic embryos of 11 *Citrus* genotypes. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 5 (2):115-123.
- Rodríguez, S.E.E. 1986 Propagación *in vitro* de limón mexicano (*C. limón* Christm swingle. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados México 87 p.
- Rubio, G.E; K.M.Yáñez. 2000. Transferencia de Tecnología y enfoque de sistemas. Colegio de Postgraduados. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Dirección General de Desarrollo Rural. México. 90 p.
- Ruíz, R.O. 1995. Agroecosistema: el término, concepto y su definición bajo el enfoque agroecológico y sistémico. En Ponencia presentada en el II Seminario Internacional de Agroecología. 29-31 de marzo. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. pp 1-9.
- SAGARPA. 2005. Limón Persa. Anuario estadístico de la producción agrícola. Sistema de Información agropecuaria de consulta. pp. 1-25.
- Sarabia, A. 1985. Un enfoque de sistemas para el desarrollo agrícola. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Editorial IICA. San José, Costa Rica.130 p.

- Simoes, M.O.M; E.A.M. DASilva; L.Teixeira; P.R.Cecom. 1990. Obtencao de brotações adventicias de *Citrus sinensis* (L). Osbek de regioes isoladas de internódios em diferentes estádios de desenvolvimento. Resvista Ceres 37:337-344.
- Singha, S; E.C.Townsend; G.H. Oberly. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 23:135-142.
- Van Gigch, J.P. 2001. Teoria general de sistemas. Editorial Trillas. México. 86 p.
- Wu, J; P. Money. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 70:99:104.
- Zimmerman, R.H. 1983. Tissue and Culture. Methods in fruit breeding. In J.N. Moore; J. Janick (eds.). W. Lafayette, Ind: Purdue Univ.Press. pp.124-135.
- Zimmerman, R.H. 1995. Enviromental effects and their control in plant tissue culture- Overview. Acta Horticulturae. 393:11-13.

CULTIVO *IN VITRO* DE PATRONES DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA, EMPLEANDO SUSTRATOS INERTES ALTERNATIVOS AL AGAR

VIII. CULTIVO *IN VITRO* DE PATRONES DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA, EMPLEANDO SUSTRATOS INERTES ALTERNATIVOS AL AGAR

8.1 INTRODUCCIÓN

Los cítricos son de los frutales más importantes en el mundo, con una producción en el 2003 de aproximadamente 98 millones de dólares. México ocupa el sexto lugar en producción, y esta actividad genera cerca de dos millones de jornales anuales (FAO, 2002). Los cítricos son susceptibles a una serie de enfermedades, plagas y condiciones adversas (edáficas, climáticas, etc.) que afectan su rendimiento (García, 1999; Carimi y Pasquale, 2003). Una de las enfermedades que potencialmente puede afectar la producción en México es el virus de la tristeza de los cítricos (VTC). En el estado de Veracruz se está en riesgo de perder cerca de 200 mil hectáreas de cítricos por esta enfermedad; porque en la mayoría de las plantaciones utilizan como portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium* L. Osbeck), que fue el más usado en el mundo. Actualmente el empleo de este portainjerto está limitado debido al alto grado de susceptibilidad que se presenta al VTC cuando se injerta con otros cítricos, como la naranja dulce, por lo que debe ser sustituido por un portainjerto tolerante o resistente. En este sentido, es necesaria la propagación de patrones tolerantes, mediante técnicas de cultivo que garanticen la producción masiva de plantas libres de patógenos (Padrón, 2000; Murcia *et al.*, 2002).

La multiplicación *in vitro* de especies de interés, requiere de investigaciones que aseguren la obtención de brotes de buena calidad con un adecuado sistema radical, garantizando el éxito de la micropropagación y la inmediata adaptación de las plantas a las nuevas condiciones ambientales (Medina-Urrutia y Valdez-Verduzco, 1990; Singh, 2002; Cervera *et al.*, 2004). Además se tiene la ventaja de que al iniciar con material sano ésta condición se mantiene, garantizando que este libre de patógenos al no estar expuesto a la intemperie.

En los estudios realizados hasta ahora, el medio de cultivo *in vitro* empleado para las diferentes especies se ha solidificado con agar y en otros casos se ha utilizado papel filtro como medio de soporte; ocasionando que al transferir las plántulas del medio *in vitro* a macetas se presente una baja sobrevivencia. Por lo antes mencionado, existe la necesidad de estudiar otro tipo de sustratos que permitan servir como soporte y que sean fáciles de usar. El propósito del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes sustratos inertes como sustitutos del agar en la multiplicación y enraizamiento *in vitro*, así como la supervivencia de plántulas de los portainjertos: *Citrus volkameriana* (*C. volkameriana*), *Citrumelo swingle* (*C. swingle*) y Citrange 35 (C- 35).

8.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El medio de cultivo utilizado para toda la investigación fue Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962) y agar (Sigma ®) 6 g l⁻¹, adicionándole en la etapa de multiplicación bencilaminopurina (BAP) 1 mg l⁻¹. En el enraizamiento se diluyeron las sales inorgánicas MS al 50%, suplementándolo con 2.5 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y vitaminas (Myo-inositol 0.1 mg l⁻¹, Thiamine 0.1 mg l⁻¹ y Pyridoxine 0.5 mg l⁻¹). Se ajustó el pH a 5.8 con KOH 1N ó HCl 1N antes de adicionar el agar y los sustratos; se esterilizó en la autoclave a 120°C durante 20 minutos. De acuerdo a la metodología de Kataoka (1994), los sustratos inertes agrolita (Multiperl^{MR}), vermiculita (SINSEMILLLA STREET 3L) y tezontle (piedra volcánica porosa, de color negro o rojizo con diámetro variable de 5 a 15 mm) (Figura 4a) se tamizaron para obtener una granulometría de 2.4 a 5 mm, esterilizándose posteriormente en la autoclave a 120°C durante 20 minutos. Colocándose 25 ml del sustrato y 20 ml del medio de cultivo en un frasco de vidrio de una capacidad de 120 ml.

Las semillas de los patrones tolerantes *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 (Figura 4b), se obtuvieron de árboles con buena producción y certificados libres de virus. Se eliminaron los tegumentos de las semillas, y se desinfectaron por inmersión durante 1 minuto, en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 2.5% más

dos gotas de Tween 20; se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. La preparación y posterior cultivo de las mismas se realizó bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar.

En cada frasco se colocaron 3 semillas para su germinación, se cultivaron a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A los brotes de 15 días de edad, se les realizaron cortes internodales, colocando tres fracciones por frasco, cada sección contenía un nudo. Los tratamientos fueron 1) MS + Agrolita; 2) MS + Vermiculita; 3) MS + Tezontle; 4) MS + Agar (Testigo). El diseño experimental fue completamente al azar, la unidad experimental la constituyó 16 frascos que contenían 3 brotes cada uno. Repitiendo este experimento cuatro veces. Las plántulas enraizadas se transfirieron a bolsas de polietileno negro de 20 x 25 cm, que contenían 5 kg de sustrato (suelo, materia orgánica, arena de río en proporción 3:1:1) esterilizado (120°C durante 20 minutos). Las plántulas se mantuvieron tapadas con plástico transparente para conservar la humedad, destapándolas paulatinamente durante 30 días, y después de este tiempo se descubrieron definitivamente. El porcentaje final de supervivencia se evaluó en ese momento.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el sistema de análisis estadístico SAS (SAS Institute, Inc., 1997). Se realizó el Análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1 GERMINACIÓN

Se observó que la germinación de las semillas de los patrones tolerantes *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. En el Cuadro I, se observa que *C. volkameriana* muestra 100% de semillas germinadas en los tratamientos con agar y vermiculita; en los tratamientos con agrolita y tezontle registró un porcentaje de germinación de 98-99%. La tasa de

germinación de los patrones tolerantes *C. swingle* y C- 35 fue de 95-99%, tanto en medio solidificado con agar como con sustratos inertes (Figura 4c y d).

Esta respuesta se debió probablemente a factores internos de las semillas, como su viabilidad y no a los factores externos (temperatura, humedad, oxígeno y luz) que intervienen en el proceso de germinación. Al respecto, se puede señalar que la humedad relativa en los frascos con el medio de cultivo fue de 100%. Además se mantuvieron a una temperatura constante de 25°C y la luz no es un factor fundamental para la germinación de semillas en cítricos. La respuesta que se obtuvo con todos los sustratos y el agar con el medio MS, fue similar a los resultados obtenidos por diversos autores (Nestares *et al.*, 1996; Germana *et al.*, 2003; Hassanein y Azooz 2003; Karwa, 2003), quienes en especies de cítricos ubican al medio de cultivo y los reguladores de crecimiento como factores no decisivos en la germinación, dado que en éste proceso intervienen grupos hormonales, inhibiendo o activando el crecimiento de las plántulas.

Los resultados obtenidos muestran que el proceso de germinación se puede dar tanto en medio de cultivo solidificado con agar como en medio de cultivo donde se adicionaron los sustratos inertes vermiculita, agrolita o tezontle. Por otra parte, el costo de un kilogramo de agar es de \$ 2026 y alcanza para 8,300 frascos de medio de cultivo, con un costo por frasco de \$ 0.244; en comparación el kilogramo de Vermiculita, que es el sustrato inerte mas caro, cuesta \$ 5.9 y alcanza para 40 frascos, con un costo por frasco de \$ 0.1475, resultando 1.69 veces mas caro el agar. Además el comportamiento de la semilla fue estadísticamente similar en ambos medios de cultivo, por lo que los sustratos inertes pueden sustituir al agar.

Cuadro I. Porcentajes de germinación, brotación y enraizamiento de los portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo*, *swingle* y C- 35.

MEDIAS Y DESVIACION ESTANDAR (%)							
Portainjertos	Sustrato	Germinación*		Multiplicación*		Enraizados*	
<i>C. volkameriana</i>	Agar	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0
	Vermiculita	100.0	± 0.0	98.0	± 1.0	99.0	± 1.0
	Agrolita	99.5	± 1.0	97.0	± 2.0	96.0	± 3.0
	Tezontle	98.4	± 2.0	96.0	± 3.0	93.0	± 1.0
<i>C. swingle</i>	Agar	99.5	± 1.0	97.0	± 2.0	98.0	± 1.0
	Vermiculita	98.9	± 2.1	96.0	± 3.0	98.0	± 1.0
	Agrolita	97.4	± 2.0	96.0	± 3.0	96.0	± 3.0
	Tezontle	96.4	± 3.0	97.0	± 2.0	94.0	± 1.0
C-35	Agar	98.9	± 2.1	95.0	± 2.1	100.0	± 0.0
	Vermiculita	98.4	± 2.0	97.0	± 2.0	99.0	± 1.0
	Agrolita	97.4	± 2.0	96.0	± 3.0	98.0	± 1.0
	Tezontle	95.8	± 1.7	96.0	± 3.0	95.0	± 2.0

* Sin diferencia estadística entre columnas ($p > 0.05$)

8.3.2 MULTIPLICACIÓN

En la formación de brotes de *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, no hubo diferencias estadísticas. Se puede observar en el Cuadro I, que los tratamientos donde al medio de cultivo se le adicionó los sustratos inertes vermiculita, agrolita o tezontle presentaron una formación de brotes estadísticamente similar al tratamiento solidificado con agar, en los tres patrones evaluados. El patrón C- 35, produjo un 95% de brotes cuando al medio de cultivo se le adicionó agar y en los sustratos inertes se obtuvo un porcentaje del 96-97% de brotes. En la Figura 2 se observa que el número de brotes formados mas frecuente fue 2 y 3 por explante, y al comparar los patrones nos muestra que *C. volkameriana* obtiene la mayor frecuencia en comparación con *C. swingle* y C- 35. Estos resultados indican que el medio de cultivo estimula las yemas

para obtener los brotes, no observándose ningún efecto de los sustratos; este efecto presentó similitud con lo reportado por Kobayashi *et al.* (2003), quienes mencionan que el tipo de medio y los reguladores del crecimiento son los factores más importantes, para obtener una estimulación de las yemas y asegurar una buena formación de brotes. En relación al efecto de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo en limón (*Citrus aurantifolia*) se encontró que el medio MS suplementado con bencilaminopurina incrementa hasta un 55% la formación de brotes (Al-Bahrany, 2002). Así mismo, Rana y Ranvir (2002a) obtuvieron un incremento en el número y largo de brotes de lima Kagzi (*C. aurantifolia*), cuando al medio de cultivo le adicionaron 1.5 mg l⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), 2.5 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y 7 g l⁻¹ agar. Sin embargo, al incrementarse la concentración a 2 mg l⁻¹ de BAP y 3 mg l⁻¹ AIB, se reduce el número de brotes por explante en lima Kagzi (*C. aurantifolia*) (Rana y Ranvir, 2002b).

En los brotes emitidos no se presentaron diferencias entre los sustratos inertes y el agar, lo que indica que su función principal es de soporte para los explantes permitiendo además la disposición de los nutrimentos. Es decir, se puede utilizar cualquiera de los tres sustratos vermiculita, agrolita o tezontle en sustitución del agar en el medio de cultivo ya que permiten la absorción de nutrimentos.

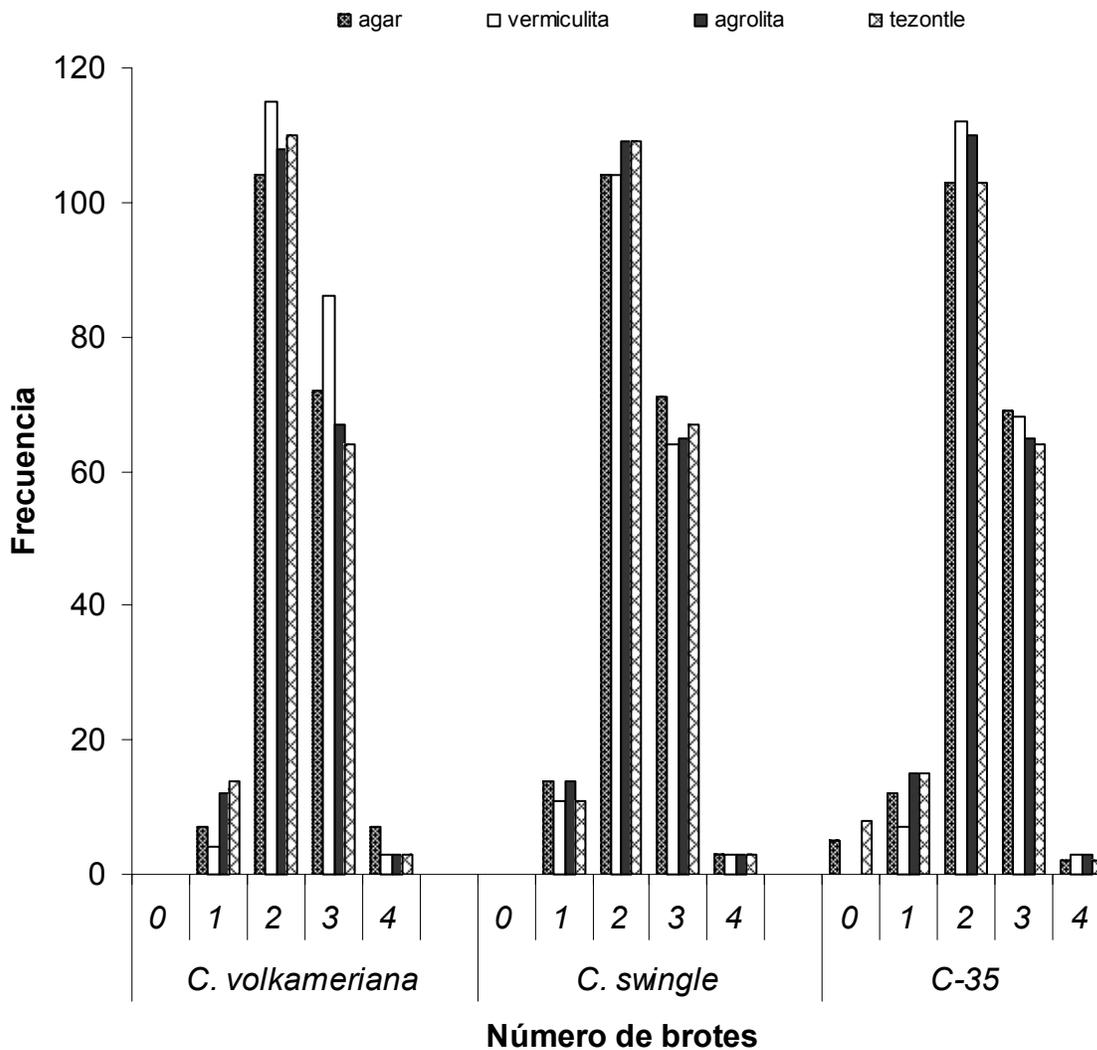


Figura 2. Frecuencia en la formación de brotes de los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35.

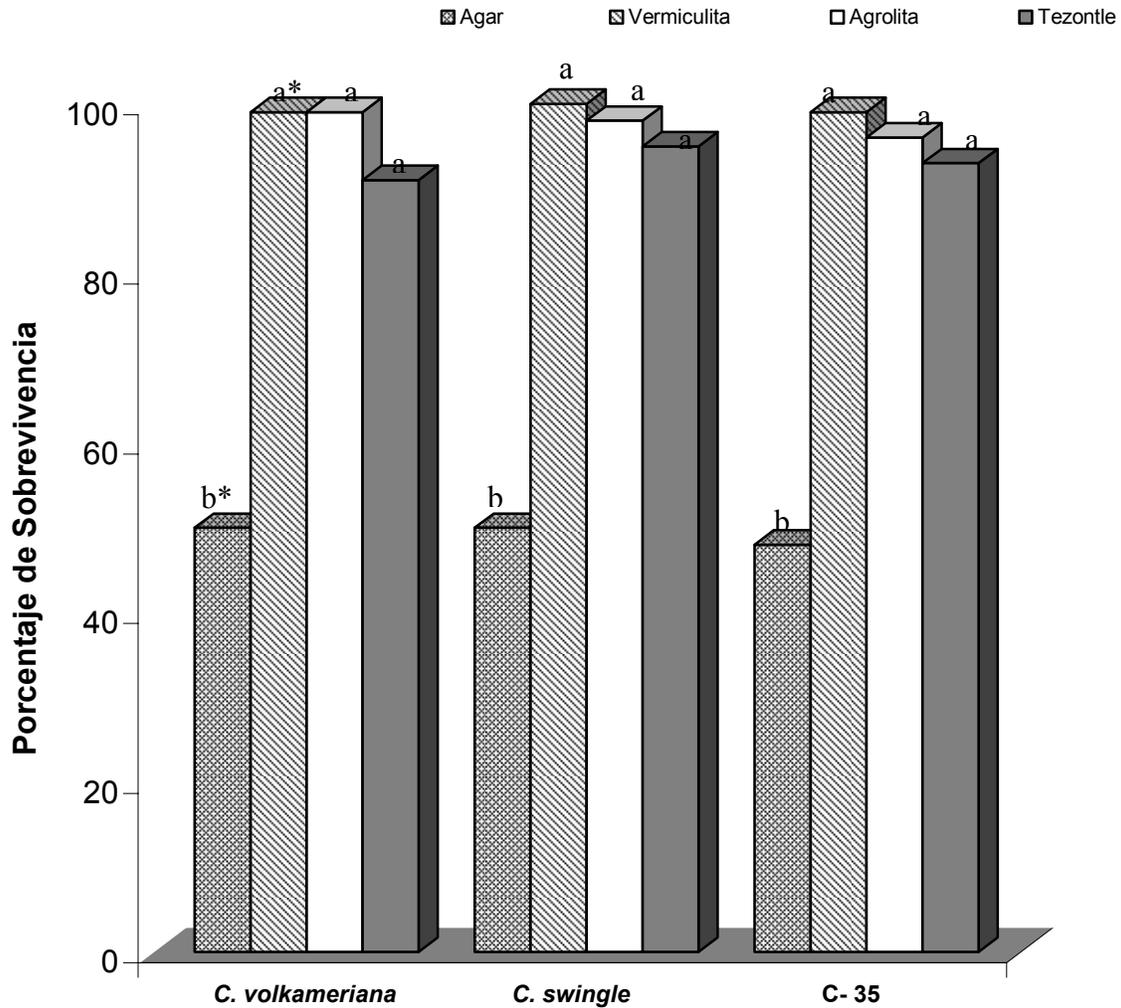
8.3.3 ENRAIZAMIENTO

Los datos obtenidos en la formación de raíces mostraron que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. En el Cuadro 2, se observa que los patrones tolerantes *C. volkameriana* y C- 35 presentaron el 100% de brotes enraizados en agar, mientras que *C. swingle* produjo 98%; en los demás sustratos el porcentaje de brotes enraizados no fue menor al 93%, para los tres portainjertos. Esta respuesta muestra que la formación de raíces se dio por la adición de los reguladores

de crecimiento y la concentración de las sales inorgánicas MS, diluidas al 50% en el medio de cultivo y no por la adición del agar, agrolita, vermiculita o tezontle. Resultados similares han reportado diferentes investigadores quienes corroboran que la combinación de hormonas promueve el enraizamiento. Karwa *et al.* (2004) mencionan que la combinación AIB, BAP y ANA induce más del 60% de brotes enraizados en *Citrus sinensis* L. En lima Kagzi se obtuvo el 92% de enraizamiento con BAP 0.2 mg + 0.1 mg ANA cuando se utilizó *C. aurantifolia* y *Citrus reticulata* Blanco, a la misma combinación adicionándole 2.5 mg l⁻¹ de paclobutrazol, se obtuvo el 87.7% de brotes enraizados de *C. aurantifolia* y el 52% en *C. reticulata* (Singh *et al.*, 2003). Así mismo, la respuesta de Mandarina Kinnow al adicionarle AIB en concentración de 0.5 mg l⁻¹ al medio de cultivo, fue de 68.8% de brotes enraizados (Al-Bahrany, 2002; Vijayakumari y Shyam, 2001; Kumar *et al.*, 2001). Con esta perspectiva donde la combinación de hormonas y la dilución de sales MS al 50%, induce al enraizamiento de los brotes, se puede utilizar entonces en el medio de cultivo los sustratos inertes en lugar de agar, ya que ambos sirven como soporte en el medio de cultivo.

8.3.4 SUPERVIVENCIA

Los resultados de la Figura 3, muestran que el mayor porcentaje de plántulas que sobrevivieron a la aclimatación para los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, fueron aquellas que provenían del medio de cultivo donde se adicionaron los sustratos vermiculita, agrolita y tezontle en una disminución gradual aunque no significativa, mostrando una respuesta de 91-100%; en comparación con aquellos brotes que provenían del medio de cultivo con agar donde la supervivencia fue 48-50%. Las plántulas provenientes del medio de cultivo solidificado con agar, se dañaron al lavar sus raíces y sufrieron estrés. Esto no pasó con las plántulas de los sustratos inertes, ya que al pasarlas de *in vitro* a *ex – vitro* el sustrato queda adherido a sus raíces y no sufren daño y el estrés es menor.



* Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas estadísticamente $p < 0.05$

Figura 3. Porcentaje de supervivencia de plantas durante la etapa de aclimatación.

Estos resultados guardan relación con lo observado por McClelland *et al.* (1990), que al usar vermiculita para la multiplicación de papaya *in vitro*, encontraron que las raíces tienen mayor aireación por estar en un medio más poroso, lo cual favorece la supervivencia de plántulas al pasarlas a macetas. En contraste, las plántulas obtenidas en el medio de cultivo con agar sufren una hipertrofia en sus raíces y el espacio intercelular es mayor, lo que limita la absorción de agua y reduce la supervivencia; aunado a la susceptibilidad que presentan las plántulas al ataque de hongos y bacterias, porque la corteza queda desnuda al lavar el agar.

Lo anterior, contrasta con lo reportado por Hazarika *et al.* (2002), quienes mencionan que el protocolo para la aclimatación de *C. reticulata*, *C. nobilis x C. deliciosa*, *C. volkameriana* y *C. reshini*, se llevó a cabo con la adición de paclobutrazol al medio de cultivo incrementando la supervivencia de las plantas hasta en un 97%. En pectinifera (*Citrus depressa* Hayata) se obtuvo el 70% de supervivencia de plantas que provenían del medio líquido MS suplementado con BAP (Gill y Gosal, 2002). Plantas de *Citrango* que provenían de medio MS sin raíces secundarias sobrevivió el 12% y aquellas que presentaban raíces secundarias sobrevivió el 25% (Plastira y Karetsoy, 2003). Los porcentajes de supervivencia obtenidos indican que los sustratos inertes incrementan la supervivencia de las plántulas provenientes de medio de cultivo *in vitro* al pasar a condiciones *ex vitro*.

El uso de sustratos inertes permitió comprobar que la función principal del agar para la germinación, brotación y formación de raíces es la de soporte; el medio de cultivo y los reguladores del crecimiento y vitaminas utilizados, son los que determinan el porcentaje de brotación y enraizamiento. Aunque a partir del agar se presentó una disminución gradual de éstos parámetros para la vermiculita, agrolita y tezontle, ésta no fue estadísticamente significativa. La supervivencia se incrementó significativamente con el uso de los sustratos inertes, porque al pasar las plántulas a las macetas sus raíces no se dañaron. Estos resultados abren la posibilidad de usar sustratos económicos y que reduzcan los efectos del estrés que sufren las plántulas al cambiarlas de condiciones de desarrollo, permitiendo explorar su uso comercial por la posible reducción en costos.

8.4 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permitieron comprobar la existencia de alternativas viables para la sustitución del agar por sustratos inertes. Comparando el agar con los sustratos inertes agrolita, vermiculita y tezontle en la germinación y en la formación de brotes y raíces de los patrones *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 no hubo diferencias entre ellos; por lo que los sustratos inertes pueden ser utilizados en sustitución del agar. La adición de los sustratos inertes al medio de cultivo en la etapa de enraizamiento para los tres portainjertos, aumentó el porcentaje de supervivencia de las plántulas. La incorporación de sustratos alternativos al agar incrementa la supervivencia hasta en un 50%, obteniendo en algunos casos hasta el 100%.

8.5 LITERATURA CITADA

- Al-Bahrany, A.M. 2002. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm) Swing. *Scientia Horticulturae* 95 (4): 285-295.
- Carimi, F; F. Pasquale. 2003. Micropropagation of citrus. In:Micropropagation of woody trees and fruits. S. M. Jain; K. Ishii (eds.). Kluwer Dortrecht,Holanda. pp. 589-619.
- Cervera, F; M.Fagoaga; C. Duran-Vila; N.L. Peña. 2004. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta Horticulturae* 632: 221-234.
- FAO. 2002. Base de datos de FAOSTAT. Food and agriculture organization. <http://www.apps.fao.org>. Consultado el 25 de marzo de 2005.
- García, L.1999. En aplicación de biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas, Modulo 3 Instituto de Biotecnología de las plantas-Cuba, Programa Nacional-Bolivia (Santa Clara-Cuba) .43 p.
- Germana, M.A; B. Chiancone; M.R. Melati; A. Firetto.2003. Preliminary results on the effect of magnetic fields on anther cultura and pollen germination of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Acta Horticulturae* 625: 411-418.
- Gill, M.I.S; S.S. Gosal. 2002. Micropropagation of pectinifera (*Citrus depressa* Hayata) potential citrus rootstock for sweet orange. *Indian Journal of Citriculture*. 1(1): 32-37.
- Hassanein, A.M; M.M. Azooz. 2003. Propagation of *citrus reticulata* via *in vitro* seed germination and shoot cuttings. *Biologia Plantarum* 47 (2):173-177.

- Hazarika, B.N; V.A. Parthasarathy; V.Nagaraju. 2002. Action of paclobutrazol in acclimatizing micropropagated citrus plantlets. *Indian Journal Agronomy Research* 36 (1): 57-60.
- Karwa, A. 2003. *In vitro* propagation of citrus reticulate blanco (*Nagpur mandarin*). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 63 (2) 187-188.
- Karwa, A; N.J. Chikhale; P.A. Wadegaonkar; M.K. Rai. 2004. Effect of various growth hormones on in vitro clonal propagation of *citrus sinensis* Osbeck. *Recent trends in biotechnology*. pp. 192-195.
- Kataoka, I. 1994. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *In Vitro*. *Japan Journal Tropical Agronomy* 38 (3): 251-257.
- Kobayashi, A.K; J.C. Bernalhok; L.F.P. Pereira; L.G.E.Vieira. 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.74 (1): 99-102.
- Kumar, K; A.S. Dhatt; M.I.S. Gill. 2001. *In vitro* plan regeneration in Kinnow mandarin (*Citrus nobilis Lour X C. deliciosa Tenora*). *Indian Journal of Horticulture* 58 (4): 299-302.
- McClelland, M.T; M.A.L. Smith; Z.B. Carothers. 1990. The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 23:115-123.
- Medina-Urrutia, V.M; J. Valdez-Verduzco. 1990. Crecimiento y producción de Limón Bears (*Citrus latifolia* Tanaka) sobre ocho portainjertos en dos condiciones de suelo, XIII Congreso Nacional de Fitogenética. 167 p.

- Murcia, R.N; A.J.Osorio; A. Caicedo; L. Calvert; F. Morales. 2002. Distribución y caracterización serológicas de aislamiento del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. 180 p.
- Murashige, T; F. Skoog. 1962. A revised médium for rapad grow and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Nestares, G; R. Zorzoli; L. Mroginski; L. Picardi. 1996. Plant regeneration from cotyledons derived from mature sunflower seeds. *Helia* 19:107-112.
- Padrón, J.E. 2000. Precauciones y uso de patrones cítricos tolerantes a tristeza. *Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C.P.* pp.36-43.
- Plastira, V.G; G. Karetsos. 2003. Effect of auxin treatment and substrate nature on *in vitro* rooting and establishment in soil of citrus plantlets. *Acta Horticulturae* 616:245-249.
- Rana, J.S; S. Ranvir. 2002a. *In vitro* clonal propagation of Kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) through shoot tips. *Progressive Horticulturae*. 34 (1):27-34.
- Rana, J.S; S. Ranvir. 2002b. Effect of agar, malt extract and phloroglucinol concentrations on the rate of shoot proliferation in kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Progressive Horticulturae* 34 (2): 247-249.
- SAS, Institute Inc. 1997. SAS/STAT User´guide, version 6.12. University of Minnesota.
- Singh, I.P.2002. Micropropagation in citrus. *Agricultural Reviews*. 23(1):1-13.

Singh, I.P; V.A Parthasarathy; P. J. Handique. 2003. Effects of bioregulators on *in vitro*-raised microshoots of economically important citrus species of the NEH region. Indian Journal of Horticulture. 60 (1): 16-21.

Vijayakumari, N; S. Shyam. 2001. Effect of growth regulators on somatic embryogenesis, morphogenesis and plantlet regeneration in *Citrus reticulata* Blanco. Indian Journal of Horticulture. 58 (4):294-298.



a



b



c



d

Figura 4. (a) Semillas de los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35. (b) Sustratos inertes tezontle, vermiculita y agrolita. (c) Brote de *C. volkameriana* en medio de cultivo MS solidificado con agar. (d) Brotes de *C. volkameriana* en medio de cultivo MS solidificado con sustrato inerte vermiculita.

**EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS, EN LA
MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS DE
CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA**

IX. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS, EN LA MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA

9.1. INTRODUCCIÓN

La citricultura es una actividad importante en el Estado de Veracruz, representa casi el 50% del total nacional, con 205 mil hectáreas plantadas con una producción de 2.78 millones de toneladas anuales, generando 32 mil empleos directos y 97 mil indirectos en la industrialización y comercialización de sus productos, con una derrama económica de tres mil 832 millones de pesos (FAO, 2005). Los cítricos que crecen en climas tropicales se ven afectados por diversas plagas y enfermedades, algunas de estas causadas por virus; una de las enfermedades más destructivas que se conocen en el cultivo de los cítricos es la tristeza, causada por el virus de la tristeza de los cítricos (VTC). Debido a esta enfermedad se han eliminado millones de árboles injertados sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L. Osbeck) en otras regiones cítricas importantes del mundo, tales como Argentina, Brasil, España, Estados Unidos y Venezuela (Gutiérrez, 1996; Orozco-Santos, 1996). En Veracruz México se está realizando un programa de diversificación productiva y la creación del biocampo, con el uso responsable de la biotecnología que incluye la reconversión de 30 millones de árboles tolerantes al VTC y mayor transferencia de tecnología (SAGARPA, 2007). Esto es por que se ha encontrado VTC tanto en viveros como en huertas comerciales donde se ha utilizado como portainjerto naranjo agrio, en ambos casos fueron eliminados los árboles afectados. Además de la amenaza que representa la presencia del pulgon café de los cítricos (*Toxoptera citricida* Kirkaldy).

En este sentido, es necesaria la propagación de patrones tolerantes, mediante técnicas de cultivo que garanticen la producción masiva de plantas libres de patógenos (Padrón, 2000; Murcia *et al.*, 2002). La multiplicación *in vitro* de especies de interés, es una alternativa que asegura la obtención de brotes de buena calidad con un adecuado sistema radical, garantizando el éxito de plantas libres de

patógenos y su inmediata adaptación a las nuevas condiciones ambientales (Medina-Urrutia y Valdez-Verduzco, 1990; Singh, 2002; Cervera *et al.*, 2004). El medio de cultivo *in vitro* contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, una fuente de carbohidratos, ácidos orgánicos y otros compuestos; además de utilizar un soporte para los explantes, esto asegura el buen desarrollo de las plantas. El tipo y concentración de fuente de carbono son notablemente variadas dependiendo del objetivo de la investigación (Chu y Figueiredo-Ribeiro, 2002; García *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Gollagunta *et al.*, 2004; Slesak *et al.*, 2004). La utilización de sacarosa es muy importante en el medio nutritivo y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural en la mayoría de las plantas superiores; generalmente se utilizan concentraciones de 15-50 g l⁻¹ (Simoes *et al.*, 1990; Zimmerman, 1995). También se puede utilizar como fuente de carbono la glucosa, galactosa, manitol, sorbitol, maltosa y la fructosa. La respuesta de la especie vegetal depende de la fuente de carbono utilizada. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de xilosa (X), fructosa (F) y 10X20F en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes de los portainjertos: *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35 (C- 35).

9.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962, MS), adicionándole en la etapa de multiplicación bencilaminopurina (BAP) 1 mg l⁻¹. En el enraizamiento se diluyeron las sales inorgánicas MS al 50 %, 2.5 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y vitaminas (Myo-inositol 0.1 mg l⁻¹, Thiamine 0.1 mg l⁻¹ y Pyridoxine 0.5 mg l⁻¹). Como medio de soporte se utilizó agar (Sigma ®) 6 g l⁻¹ y vermiculita (SINSEMILLA STREET 3L). El medio se ajustó a pH 5,8 con KOH1N y/o HCl1N antes de adicionar el agar y la vermiculita, se esterilizó en la autoclave a 120 °C durante 20 minutos. De acuerdo a la metodología de Kataoka (1994), la vermiculita se tamizó con el objetivo de obtener un diámetro de granos de 2.4 a 5 mm. Colocándose 25 ml de vermiculita y 20 ml del medio de cultivo en un frasco de vidrio de una capacidad de 120 ml. Como

fuentes de carbono se utilizó xilosa 10 g l⁻¹, fructosa 20 g l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹ y la combinación de xilosa y fructosa (10X20F g l⁻¹).

Las semillas de los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, se obtuvieron de árboles con buena producción y certificados libres de virus. Se eliminaron los tegumentos de las semillas, y se desinfectaron por inmersión durante 1 minuto, en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 2.5% más dos gotas de Tween 20; se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se pusieron a germinar en el medio de cultivo. Una vez obtenidas las plántulas *in vitro* se procedió a cortar segmentos nodales de 1 cm de longitud, de cada uno de los portainjertos, se desinfectaron por inmersión durante 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 2.5%, más dos gotas de Tween 20; se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. La preparación y posterior cultivo de los mismos se realizó bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar. En cada frasco con medio de cultivo se colocaron tres segmentos cultivándose a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3X4X2, (portainjertos, fuentes de carbono, medio de soporte), la unidad experimental la constituyó 16 frascos que contenían 3 brotes cada uno, con cuatro repeticiones. Los datos obtenidos se analizaron mediante el Sistema de Análisis SAS (SAS Institute, Inc, 1997). Se realizó el análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$)

9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1 MULTIPLICACIÓN

La formación más frecuente de brotes en los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 fue 2 y 3 por explante (Figura 7a), no encontrándose diferencias estadísticas. Además se puede observar que los tratamientos donde se adicionó 10X/20F y solidificados con vermiculita, presentan una formación de brotes estadísticamente similar ($p=0.05$) al tratamiento con agar, en los tres portainjertos evaluados. Por otro lado se puede observar un porcentaje menor al 10% para la respuesta de cero brotes, en los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 en todos los medios de cultivo con los azúcares xilosa, fructosa, 10X20F y sacarosa, solidificando el medio con agar y vermiculita (Figura 5a y b).

Estos resultados indican que los azúcares estimularon las yemas para obtener dos brotes, el tipo de medio y los reguladores de crecimiento es lo más importante para obtener una estimulación de las yemas y asegurar una buena formación de brotes (Kobayashi *et al.*, 2003). Por otro lado, Faria *et al.* (2004) encontraron en híbridos de especies de orquídeas (*Dendrobium nobile*), un incremento en el número de brotes con concentraciones de 20 g l^{-1} de sacarosa, esto indica que la sacarosa es uno de los componentes del medio de cultivo que proporciona a los brotes carbón y energía. Resultados similares obtuvieron Gürel y Gülsen (1998), en almendros (*Amygdalus communis* L.) con una concentración de sacarosa del 50% obtuvieron un promedio de 2.3 brotes por yema. Gollagunta *et al.* (2004) mencionan que la reducción al 50% de glucosa, fructosa y sacarosa incrementan el número de brotes por yema de *Hosta tokudama* Tratt, "Newberry Gold".

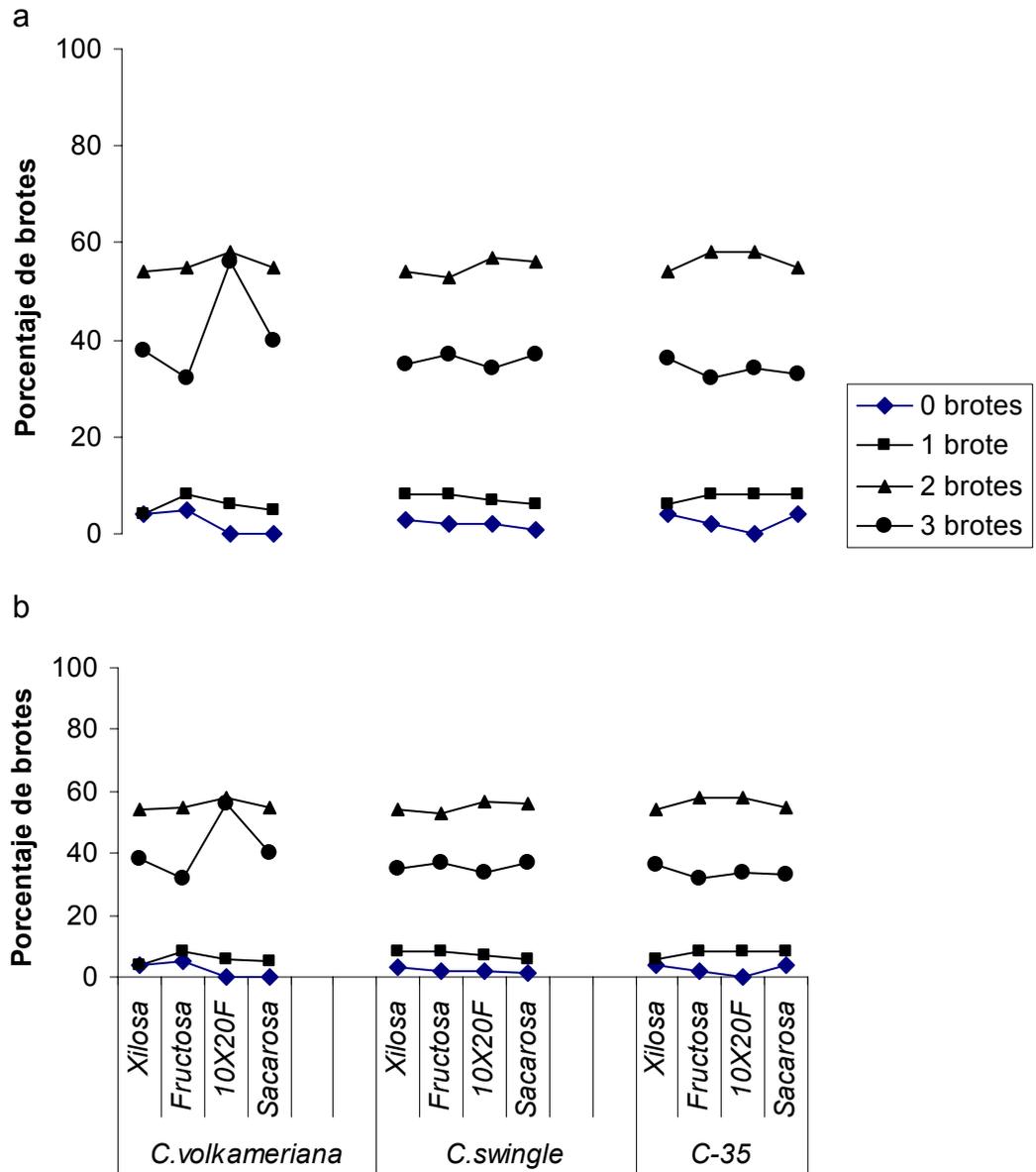


Figura 5. Porcentaje de brotes por explante de los patrones *C. volkammeriana*, *C. swingle* y C-35 con diferentes azúcares en agar (a) y Vermiculita (b)

9.3.2 ALTURA DE LOS BROTES Y NÚMERO DE HOJAS

En el Cuadro 2, se observa que el portainjerto *C. volkameriana* presentó la mayor altura de brotes con la combinación 10X/20F y sacarosa en el medio solidificado en agar y con el sustrato inerte vermiculita. Mientras que *C. swingle* y C-35 presentaron una menor altura 1.67 a 1.68 cm, con xilosa y fructosa en ambos medios de soporte (Figura 7b). Con respecto al número de hojas se encontraron 3 por brote, en todos los tratamientos, no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos (Figura 7c).

Los datos descritos muestran que los carbohidratos estudiados no incrementaron la altura de brotes y número de hojas; lo que indica que la presencia del azúcar es importante no así la fuente, debido a que la respuesta fue muy similar en los tres portainjertos. Sin embargo, en otros trabajos han observado que la adición de carbohidratos como la sacarosa al medio de cultivo *in vitro* incrementa la altura de brotes y el contenido de biomasa (Gómez y Segura, 1995; Song *et al.*, 1999; Faria *et al.*, 2004). Por otro lado, Gollagunta *et al.* (2004) han mencionado que el efecto de la sacarosa en el medio de cultivo mejoró la calidad de los brotes y son los mas efectivos en convertir azúcares a materia seca.

Cuadro 2. Altura de los brotes, número de hojas por brote y número de raíces por brote de los portainjertos de *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, con la presencia de diferentes azúcares.

Portainjertos	Sustrato	Azúcar	Altura de los brotes* (cm)	No. de hojas por brote*	No. de raíces por brote*
<i>C. volkameriana</i>	Agar	10X/20F	1.71	3.01	2.00
		Sacarosa	1.71	3.04	2.61
		Xilosa	1.67	3.02	2.51
		Fructosa	1.67	3.04	2.51
	Vermiculita	10X/20F	1.71	3.00	3.01
		Sacarosa	1.71	3.00	2.51
		Xilosa	1.67	3.00	2.48
		Fructosa	1.68	3.03	
<i>C. swingle</i>	Agar	10X/20F	1.69	3.00	2.55
		Sacarosa	1.68	3.00	2.51
		Xilosa	1.67	3.04	2.35
		Fructosa	1.68	3.02	2.48
	Vermiculita	10X/20F	1.71	3.00	3.02
		Sacarosa	1.68	3.00	2.48
		Xilosa	1.68	3.02	2.31
		Fructosa	1.68	3.00	2.44
C- 35	Agar	10X/20F	1.68	3.09	2.47
		Sacarosa	1.68	3.03	2.50
		Xilosa	1.67	3.00	2.48
		Fructosa	1.67	3.06	2.51
	Vermiculita	10X/20F	1.68	3.03	2.45
		Sacarosa	1.68	3.02	2.48
		Xilosa	1.67	3.00	2.44
		Fructosa	1.67	3.04	2.50

* Sin diferencia estadística entre columnas ($p < 0.05$)

9.3.3 BROTES ENRAIZADOS Y NÚMERO DE RAÍCES ADVENTICIAS

En el Cuadro 2, se observa que los portainjertos, *C. volkameriana* (Figura 7d) y *C. swingle* presentaron 3 raíces absorbentes por brote con la combinación 10X20F, en el medio de cultivo con el sustrato inerte vermiculita. El portainjerto C- 35 produjo 2.5 raíces por brote con los dos sustratos y los diferentes azúcares. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la adición de xilosa, fructosa y 10X20F en el medio de cultivo estimulan la formación de raíces al igual que la sacarosa.

En la Figura 6, se muestra que el mayor porcentaje de brotes enraizados para los tres portainjertos, fueron aquellos que provenían del medio donde se le adicionó la combinación 10X20F y sacarosa, obteniendo el 99-100% de brotes enraizados independientemente del sustrato utilizado, con una disminución gradual aunque no significativa. En comparación los brotes que provenían del medio de cultivo con xilosa y fructosa presentaron 75-89%, con ambos sustratos.

Los resultados guardan relación con lo observado por Pio *et al.* (2002), quienes mencionan que el enraizamiento *in vitro* de *Citrus tangerina* se obtiene cuando al medio de cultivo se le adicionó sacarosa en un 30%, es importante señalar que la sacarosa además de ser la fuente principal de carbono y energía tiene un papel osmorregulador, siendo esencial para la formación de raíces. Este hecho manifiesta la relevancia que tiene la sacarosa en el medio de cultivo *in vitro* y abre la posibilidad de usar otros carbohidratos en el medio, sin afectar sensiblemente el desarrollo.

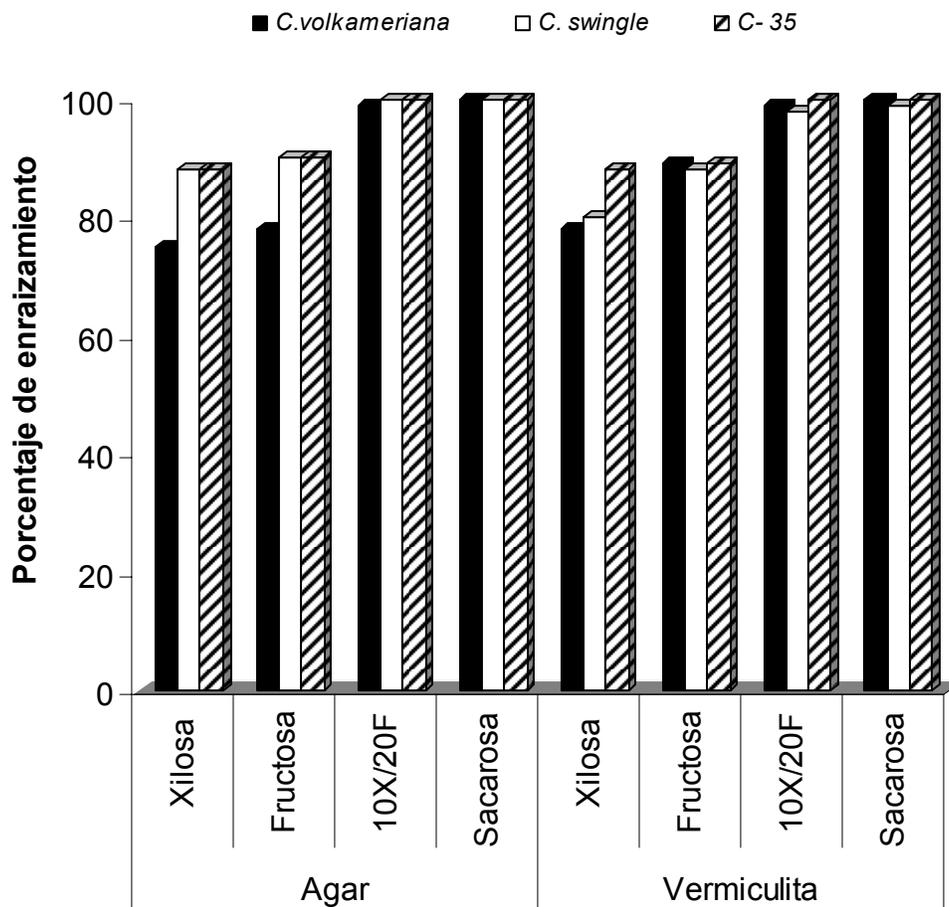


Figura 6. Porcentaje de brotes enraizados de *C. volkameriana*, *C. swingle* y C-35, con diferentes azúcares

Al utilizar el sustrato inerte vermiculita no se observaron diferencias en ninguno de los aspectos evaluados con respecto al agar, lo que indica que este sustrato puede sustituir al agar. Esto es similar a lo observado por Martínez-Hernández *et al.* (2006), que observaron que el sustrato inerte tiene un efecto similar al agar en la multiplicación de los explantes.

9.4 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permitieron comparar diferentes fuentes de carbohidratos. La sacarosa y la combinación de 10X20F presentaron la mejor respuesta en la multiplicación, altura de brotes, número de hojas y formación de raíces de los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35 y no hubo diferencias estadísticas entre ellos. El porcentaje de enraizamiento con sacarosa y la combinación 10X20F fue del 99-100%, mientras que xilosa y fructosa solo alcanzó el 75-89%. Comparando el agar con el sustrato inerte vermiculita el comportamiento de los brotes fue muy similar, por lo que el sustrato vermiculita puede ser utilizado en sustitución del agar.

9.5 LITERATURA CITADA

- Cervera, F; M.Fagoaga; C. Duran-Vila; N.L. Peña. 2004. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta Horticulturae* 632: 221-234.
- Chen, Y; S. Lin; P. Duguid; E. Dribnenki; E. Kenaschuck. 2003. Effect of sucrose concentration on elongation of shoots from flax anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68:49-55.
- Chu, E.P; R.C.L. Figueiredo-Ribeiro. 2002. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 70:241-249.
- FAO. 2005. Base de datos de FAOSTAT. Food and agriculture organization. <http://www.apps.fao.org>. Food and agriculture organization. Consultado el 15 de Abril de 2006.
- Faria, R.T; F.N. Rodrigues; L.V.R.Oliveira; C. Müller. 2004. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, Brasilia, 22 (4):780-783.
- Garcia, J.L; J.Troncoso; R. Sarmiento; A.Troncoso. 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 95-109.
- Gollagunta, V.J; W. Adelberg; R.Rieck; N. Rajapakse. 2004. Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 77:125-131.
- Gomez, M.P; J. Segura. 1995. Axillary shoot proliferation in cultures of explants from mature *Juniperus oxycedrus* trees. *Tree Physiology* 15(9):625-628.

- Gürel, S; Y. Gülsen. 1998. The effects of different sucrose, agar and pH level on *in vitro* shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. Journal of Botany 22:363-373.
- Gutierrez, E.M.A. 1996. Memorias IV simposium internacional sobre sistemas de producción de cítricos. Universidad Autónoma Chapingo, Vol.1. 28-3 de Octubre. Tuxpan, Ver., México. pp. 95-98.
- Kataoka, I. 1994. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *in vitro*. Japan Journal Tropical Agronomy 38 (3): 251-257.
- Kobayashi, A.K; J.C. Bernal; L.F.P. Pereira, L.G.E. Viera. 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 74(1):99-102.
- Martínez-Hernández, M.D.J; L.A. Alonso, F.Osorio-Acosta; L.F. Gallardo; M.López; R.M. Mata. 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.
- Medina-Urrutia, V.M; J. Valdez-Verduzco. 1990. Crecimiento y producción de Imón Bears (*Citrus latifolia* Tanaka) sobre ocho portainjertos en dos condiciones de suelo, XIII Congreso Nacional de Fitogenética. 167 p.
- Murashige, T; F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid grow and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15: 473-497.
- Murcia, R.N; A.J.Osorio; A. Caicedo; L. Calvert; F. Morales. 2002. Distribución y caracterización serológicas de aislamiento del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. Fitopatología Colombiana 26:21-26.

- Orozco-Santos, M. 1996. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo, México. 150 p.
- Padrón, J.E. 2000. Precauciones y uso de patrones cítricos tolerantes a tristeza. Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C.P. pp.36-43.
- Pio, R; J.D.Ramos; L.A.S. Pio; V.Mendonca; A.B. Silva; M. Pasqual. 2002. *In vitro* rooting of sprouts of Tangerina sunki x Trifoliata english 63-256 citrus rootstocks through the use of sucrose and indolebutyric acid. *Ciência e Agrotecnologia*. 26 (1) 66-70.
- SAGARPA. 2007. Sembrando soluciones. Secretaria de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
<http://www.sagarpa.gob.mx/cgs/sembrando>. Consultado el 11 de Marzo de 2007.
- SAS, Institute Inc. 1997. SAS/STAT User´guide, version 6.12. University of Minnesota.
- Simoes, M.O.M; E.A.M. Da Silva; L.Teixeira; P.R. Cecom. 1990. Obtencao de brotaoes adventicias de *Citrus sinensis* (L). Osbek de regioes isoladas de internódios em diferentes estádios de desenvolvimiento. *Resvista Ceres* 37:337-344.
- Singh, I.P. 2002. Micropropagation *in citrus*. *Agricultural Reviews* 23(1):1-13.
- Slesak, H; A. Skoczowski; L. Przywara. 2004. Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 79:45-5.

Song, M.K.R; G.L. Silva; R.T.Faria; L.S.A.Takahashi. 1999. Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium novile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e plantas ornamentais. Jaboticabal, Anais. SP, Brasil. p110.

Zimmerman, R.H. 1995. Environmental effects and their control in plant tissue culture Overview. *Acta Horticulturae* 393:11-13.



a



b



c



d

Figura 7. (a) Brote *C. volkameriana* en el medio de cultivo MS y la combinación de azúcar 10X20F solidificado con agar. (b) Medición de altura de brote C- 35 que proviene del medio de cultivo MS solidificado con agar. (c) Número de hojas del brote de *C. swingle*. (d) Brote enraizado de *C. volkameriana* en el medio de cultivo MS solidificado con agar.

**ACLIMATACIÓN DEL PORTAINJERTO TOLERANTE AL VTC *Citrus volkameriana*
MEDIANTE LA REGULACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ**

X. ACLIMATACIÓN DEL PORTAINJERTO TOLERANTE AL VTC *Citrus volkameriana* MEDIANTE LA REGULACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ

10.1 INTRODUCCIÓN

Durante la aclimatación de las plántulas *in vitro*, se registran tasas altas de mortalidad, debido a las limitaciones de éstas para resistir el estrés del trasplante. Esas limitaciones dependen fundamentalmente de las particularidades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan al desarrollarse *in vitro*; las cuales provienen de una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono con una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Debergh, 1991; Paques, 1991; Preece y Sutter, 1991b; Pedraza-Santos *et al.*, 2001; Hazarika, 2003).

Entre los principales problemas que presentan las plantas *in vitro* se encuentran, estomas poco funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas, ineficiencia fotosintética ocasionada por los bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético, además de la capacidad reducida de formar cutícula cerosa por la escasa presencia de los tejidos colénquima y esclerénquima (Marino *et al.*, 1991; Preece y Sutter, 1991a; Rohr *et al.*, 2003).

Durante los primeros días después del trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente crear las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones; se requiere evitar el exceso de transpiración de las plántulas y mantener una alta humedad hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de sus estomas y cutículas. El controlar la intensidad de luz en esta fase es importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja, por lo tanto ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético (Celestino *et al.*, 1999; Daquinta *et al.*, 2000). Así que, el proceso de aclimatación es complejo por el control de las

condiciones ambientales que durante ésta fase es determinante en la supervivencia de las plantas. El propósito de la presente investigación fue evaluar diferentes niveles de intensidad de luz en la etapa de aclimatación de plántulas del portainjerto *Citrus volkameriana*, obtenidas *in vitro* con vermiculita.

10.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (1962, MS) adicionándole en la etapa de multiplicación bencilaminopurina (BAP) 1 mg l^{-1} . Como medio de soporte se utilizó agar (Sigma ®) 6 g l^{-1} ; y vermiculita (SINSEMILLA STREET 3L). En el enraizamiento se diluyeron las sales inorgánicas MS al 50%, suplementándolo con 2.5 mg l^{-1} de ácido indolbutírico (AIB) y vitaminas (Myo-inositol 0.1 mg l^{-1} , Thiamine 0.1 mg l^{-1} y Pyridoxine 0.5 mg l^{-1}). Se ajustó el pH a 5,8 con KOH 1N ó HCl 1N antes de adicionar el agar y el sustrato inerte; se esterilizó en la autoclave a 120°C durante 20 minutos. De acuerdo a la metodología de Kataoka (1994), la vermiculita se tamizó para obtener una granulometría de 2.4 a 5 mm, esterilizándose posteriormente en la autoclave a 120°C durante 20 minutos. Colocándose 25 ml del sustrato y 20 ml del medio de cultivo en un frasco de vidrio de una capacidad de 120 ml. Las semillas del portainjerto *C. volkameriana*, se obtuvieron de árboles con buena producción y certificados libres de virus. Se eliminaron los tegumentos de las semillas y se desinfectaron por inmersión durante 1 minuto, en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 2.5% más dos gotas de Tween 20; se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. La preparación y posterior cultivo de las mismas se realizó bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar. En cada frasco se colocaron 3 semillas para su germinación, cultivándose a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A los brotes de 15 días de edad se les realizaron cortes internodales, colocando tres fracciones por frasco, cada sección contenía un nudo.

Las plantas enraizadas se extrajeron de los frascos con medio de cultivo para evaluar su supervivencia bajo condiciones *ex vitro* y se colocaron en charolas de plástico, con dos tipos de sustratos, unas contenían agrolita y las otras una mezcla de suelo, materia orgánica y arena de río en proporción 3:1:1 (Figura 9b,c,d), esterilizado (120°C durante 20 minutos). Se trasplantaron 120 plantas con las intensidades de luz (medida en lux) 350, 700 y 1050 (Figura 9a). El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3X2X2 (intensidad de lux, medios de soporte y sustratos) con 4 repeticiones, la unidad experimental la constituyó 30 plantas. La humedad relativa fue de 100, 75 y 50%, en todos los tratamientos disminuyéndola cada 10 días. Los datos obtenidos se analizaron mediante el Sistema de Análisis SAS (SAS Institute, Inc.1997). Se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

10.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que la supervivencia de las plantas de *C. volkameriana* en las tres intensidades de luz, presentaron diferencias significativas entre tratamientos. La supervivencia con 350 luz fue del 100% y con los tratamientos 700 y 1050 luz, se registró un porcentaje de supervivencia de 65 y 43%, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de supervivencia de *Citrus volkameriana* con 350, 700 y 1050 luz.

MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTANDAR (%)				
Portainjerto	Luz		Supervivencia	
<i>C. volkameriana</i>	350	a*	100.0	± 0.0
	700	b*	65.0	± 19.2
	1050	c*	43.0	± 14.5

* Diferencia estadística entre columnas (p<0.05)

Los sustratos agrolita y suelo con los medios de soporte agar y vermiculita no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. En el Cuadro 4, se observa que los medios de soporte vermiculita y agrolita registraron un porcentaje de supervivencia de 78%, mientras que con suelo se presentó el 72%. Con el medio de soporte agar en suelo se obtuvo el 68% y con agrolita 60% de sobrevivencia.

Cuadro 4. Porcentaje de supervivencia de *C. volkameriana* con medios de soporte *in vitro* agar y vermiculita, sustratos agrolita y suelo.

MEDIAS Y DESVIACION ESTANDAR (%)		
Portainjerto	Medio de soportes +sustratos	Sobrevivencia
<i>C. volkameriana</i>	Vermiculita + agrolita	78.00 ± 19.37*
	Vermiculita + suelo	72.00 ± 22.59
	Agar + suelo	68.00 ± 26.18
	Agar + agrolita	60.00 ± 36.66

*Sin diferencia estadística entre columnas ($p > 0.05$)

Los sustratos agrolita y suelo utilizados en el transplante no influyeron en la supervivencia de las plántulas. Las diferencias observadas entre intensidades luminosas indica, que la baja intensidad de luz determina la supervivencia de las plantas, independientemente del sustrato ya que la humedad relativa fue disminuyendo de 100%, 75% a 50% cada diez días, en todos los tratamientos. La muerte de las plantas se presentó durante los primeros 5 días de transplantadas.

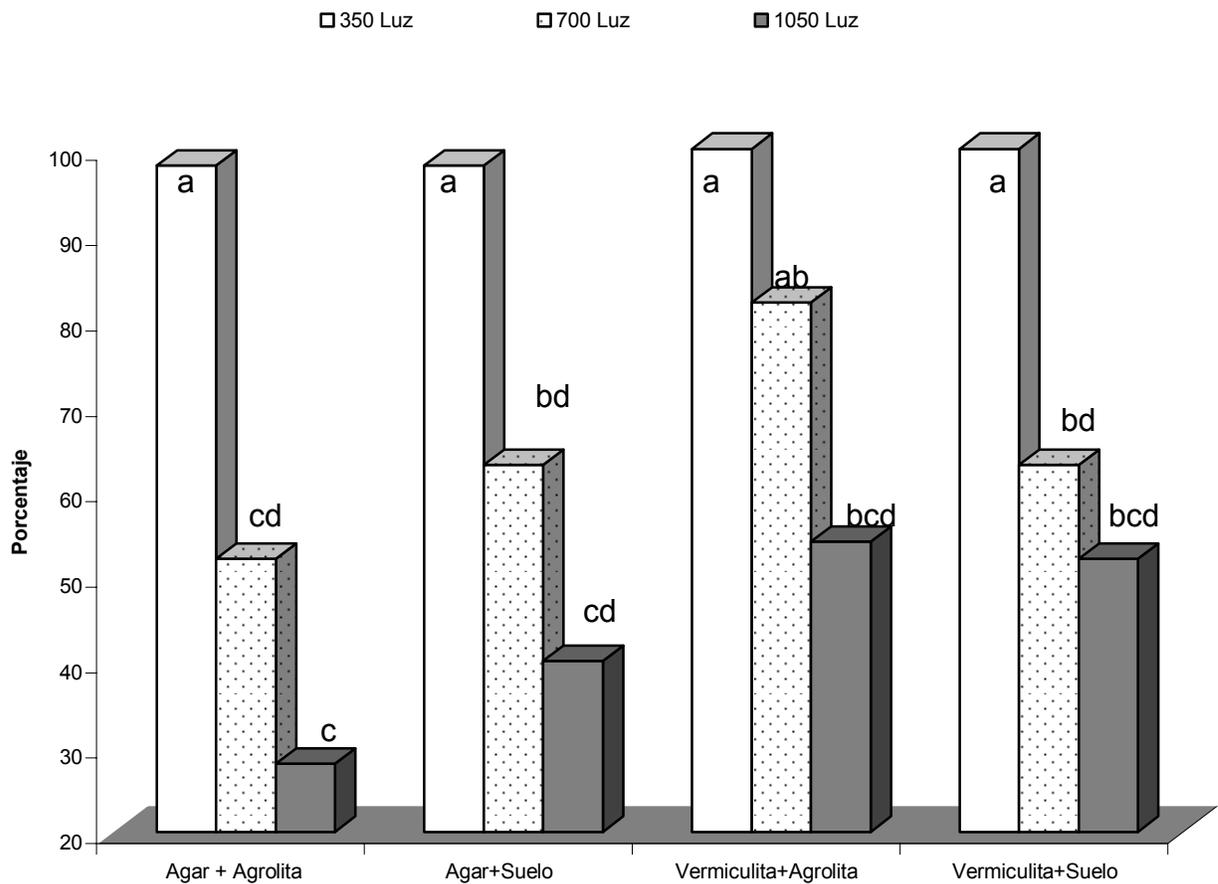
Los sustratos utilizados en el cultivo *in vitro* son muy importantes para la supervivencia al pasar a condiciones *ex Vitro*. Martínez-Hernández *et al.* (2006) observaron una supervivencia de 91-100%, al utilizar sustratos inertes en los portainjertos *C. volkameriana*, *C. swingle* y C- 35, en comparación con aquellos brotes que provenían del medio de cultivo con agar donde la supervivencia fue 48-50%. Las plántulas provenientes del medio de cultivo solidificado con agar, se dañaron al lavar sus raíces y sufrieron estrés. Esto no pasó con las plántulas del sustrato inerte vermiculita, ya que al pasarlas de *in vitro* a *ex – vitro* el sustrato quedó

adherido a sus raíces y no sufrieron daño y el estrés fue menor. Así mismo McClelland *et al.* (1990) encontraron que al usar vermiculita para la multiplicación de papaya *in vitro*, las raíces tuvieron mayor aireación por estar en un medio más poroso, lo cual favoreció la supervivencia de las plántulas al pasarlas a macetas.

Las plántulas obtenidas en el medio de cultivo con agar sufren una hipertrofia en sus raíces y el espacio intercelular es mayor, lo que limita la absorción de agua y reduce la supervivencia; aunado a la susceptibilidad que presentan las plántulas al ataque de hongos y bacterias, porque la corteza queda desnuda al lavar el agar (Kataoka, 1994).

Los sustratos inertes favorecen el incremento en los porcentajes de supervivencia de las plántulas provenientes de medio de cultivo *in vitro* al pasar a condiciones *ex vitro*, por el menor daño a las raíces. El daño radicular es un factor que afecta la supervivencia como se observó en plantas de *Citrango* que provenían de medio MS, sin raíces secundarias sobrevivió el 12% y aquellas que presentaban raíces secundarias sobrevivió el 25% (Plastira y Karetos, 2003). En plátano Hartón (*Musa AAB*) sobrevivió el 93 % de plantas colocadas en charolas con sustrato, mientras que a raíz desnuda solo sobrevivió el 68% (Nava y Villareal, 1998).

En la Figura 8, se muestra la supervivencia de *C. volkameriana* y se aprecia que se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Así mismo, podemos observar que el mayor porcentaje de supervivencia (100%) fue para el tratamiento 350 luz, con los brotes que provenían del medio de cultivo con vermiculita, y sembrados en agrolita o la mezcla de suelo; mientras aquellos brotes que provenían del medio de cultivo con agar y sembrados en agrolita y suelo obtuvieron el 98% de supervivencia. Por otro lado, el tratamiento con 700 luz presentó el 52-81%, mientras que con 1050 luz se presentó el menor porcentaje de supervivencia con 28-54%. Al combinar los tratamientos se puede observar que la regulación de la luz y el sustrato vermiculita fueron determinantes para la supervivencia de plantas, ya que las condiciones de humedad relativa fueron iguales.



* Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticamente tukey $\alpha = 0.05$

Figura 8. Supervivencia de *Citrus volkameriana* durante el transplante en suelo y agrolita, con diferentes intensidades de luz.

El control de la intensidad de la luz es importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad luminosa baja, por lo que ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético (Agramonte *et al.*, 1998). Trindade y Paris (1997) lograron entre 90 y 95% de supervivencia de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus globulus* en la fase de aclimatación, cuando proporcionaron diferentes porcentajes de sombra 30-70% con mallas plásticas. En las plantas *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*, se alcanzan porcentajes de supervivencia de 75% y 85% respectivamente, proporcionando 70% de sombra (Martínez-Ruiz *et al.*, 2005). También la humedad relativa es un factor determinante de la supervivencia. Pierik

(1990) menciona que usando una humedad relativa alta durante el proceso de aclimatación, la cual se va reduciendo gradualmente hasta alcanzar el nivel normal aumenta la supervivencia de las plantas.

En el cultivo de la papa se observó que al descender la humedad relativa hasta el 85%, las plantas resistieron el trasplante *ex vitro* (Tanaka *et al.*, 1992). Mientras que Whish y Williams (1992) encontraron una reducción de la frecuencia estomática del marañón logrando el 87% de supervivencia al disminuir la humedad relativa hasta el 80%, lo cual indica que las plantas pueden ser resistentes a la sequía.

En Santa Rita (*Bougainvillea* sp) se obtuvo el 100% supervivencia utilizando una cámara húmeda con el 90% de humedad relativa y en gerbera se obtuvo 82-48% de supervivencia; así mismo, el proceso de aclimatación en cámara húmeda permitió que las plantas *in vitro* de jengibre desarrollaran una cutícula bien estructurada, un mesófilo completamente diferenciado y haces vasculares hacia ambas epidermis, logrando pasar en forma eficiente a las condiciones *ex vitro*, con un efectivo establecimiento a las condiciones de campo (Olivera-Ortega *et al.*, 2000; Escandón *et al.*, 2003; Him y Páez, 2004).

10.4 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permitieron comprobar la existencia de alternativas de aclimatación de plántulas enraizadas *in vitro*. La combinación de la intensidad de luz y la humedad relativa fueron determinantes en la supervivencia de plántulas del portainjerto *C. volkameriana*. Con la menor intensidad luminosa (350 luz) se logró una supervivencia de 100%, obteniéndose en los casos de 700 luz 52-81% y 1050 luz 28-54% de supervivencia respectivamente. El sustrato vermiculita puede sustituir como medio de soporte al agar en el cultivo de tejidos por que mejora la supervivencia de las plántulas, además de ser más económico.

10.5 LITERATURA CITADA

- Agramonte, D; F.M.A. Jiménez; A. Dita. 1998. Aclimatización en propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Editorial Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 400 p.
- Celestino, C.B; I.Hernández; M. Molinas; P. Puigderrajols; I. Martínez; J. Hornero; F.J. Gallego; J. L.Manjón; J. Diéz; M.Toribio. 1999. Somatic embryogenesis in cork oak (*Quercus suber* L.). In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. S. Espinel; E. Ritter.Biofor. 99. (eds.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 195-197.
- Daquinta, G.M.L; R. Lezcano; M. Escalona. 2000. Algunos elementos en la micropropagación de la teca. *Biotecnología Vegetal*.1:39-44.
- Debergh, P. 1991. Acclimatization techniques of plant from *in vitro*. *Plant Biotechnology. Acta Horticulturae* 289:271-299.
- Escandón, A.S; P. Ferrari; G. Facciuto; S.Soto; J.C. Hagiwara; A. Acevedo. 2003. Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Abr.) una arbustiva de relevancia ornamental. *RIA*. 32(1):111-112.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85 (12):1704-1712.
- Him, Y; J. Páez. 2004. Anatomía foliar comparada de plantas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivadas en tres ambientes de crecimiento. *Bioagro* 16(1):27-30.
- Kataoka, I.1994. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *In Vitro*. *Japan Journal Tropical Agronomy* 38 (3): 251-257.

- Marino, G; E. Magnanini; S. Battisyini; B. Righertti. 1991. Effect of hormones and main carbon energy sources on *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cvs 'San Castrese and Portici'. Acta Horticulturae 293(2):355-362.
- Martínez-Hernández, M.D.J; L.A. Alonso; F.Osorio-Acosta; L.E.Gallardo; M.López; R.M. Mata. 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.
- Martínez-Ruiz, R.H.S; J.L. Azpíroz-Rivero; L. Rodríguez-De; O.M.V. Cetina-Alcalá; M.A.Gutiérrez-Espinosa. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake y *Eucalytus grandis* HILL EX MAIDEN. RaXimhai.1 (3):591-597.
- Mcclelland, M.T; M.A.L. Smith; Z.B. Carothers. 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 23:115-123.
- Murashige, T; F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid grow and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15: 473-497.
- Nava, C; E. Villareal. 1998. Efecto de los métodos de transporte y aclimatación sobre las características y rendimiento de las plantas de plátano Hartón (*Musa* AAB) originadas por cultivo de tejidos. Rev.Fac.Agron. (Luz) 15:115-122
- Olivera-Ortega, V.Z; M.A Gutiérrez-Espinosa; J.A.Gutiérrez-Espinosa; M. Andrade-Rodríguez. 2000. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su Aclimatación en invernadero. Bioagro 12(3):75-80.
- Paques, H. 1991. Aclimatization techniques. Plant Biotechnology. Acta Horticulturae 288:291-300.

- Pedraza-Santos, M; D. Jaen-Contreras; A. Gutiérrez-Espinosa; T.Colinas-León; C. López-Peralta. 2001. Crecimiento y nutrición de microplantas de gerbera inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares. *Agrociencia* 35 (2):149-158.
- Plastira, V. G; G. Karetsos. 2003. Effect of auxin treatment and substrate nature on *in vitro* rooting and establishment in soil of citrus plantlets. *Acta Horticulturae* 616:245-249.
- Pierik, R.L.M. 1990. Preparación y composición del medio de cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ª. Ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 45-86.
- Preece, J.E; E.G. Sutter. 1991a. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: *Micropropagation. Technology and application*. P.C Debergh; R.H Zimmerman.(eds.). Kluweracademic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 71-93.
- Preece, J.E; E.G. Sutter. 1991b. Epicuticular wax formation on carnation plantles regenerated from shoot tip culture. *Journal American Society Horticulture Science* 104 (4):493-496.
- Rohr, R; I.Iliev; A. Scaltsoyiannes; P. Tsoulpha. 2003. Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae* 616, 59-69.
- SAS, Institute Inc. 1997. *SAS/STAT User´guide*, version 6.12. University of Minnesota.
- Tanaka, K; K. Fujiwara; T. Kozai. 1992. Effects of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*. *Acta Horticulturae* 319:59-64.

Trindade, H; E. Paris.1997. "*In vitro* studies on Eucalyptus globulus rooting ability. "*In vitro*" Cellular and Developmental Biology Plantarum". 33(1):1-5.

Whish, J.P.M; R.R. Williams.1992. Acclimatización-effects of reduced humidity *in vitro*. Acta Horticulturae 319:231-234.



a



b



c



d

Figura 9. (a) Modulo para la aclimatación de plantas de *C. volkameriana* con una intensidad de luz de 350. (b), Plántulas de *C. volkameriana* sembradas en agrolita que provienen de medio de cultivo MS, solidificado con agar. (c) plántulas de *C. volkameriana* sembradas en suelo, que provienen de medio MS, solidificado con vermiculita. (d) planta de *C. volkameriana* aclimatada a una intensidad de luz de 350.

XI. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

La finalidad de esta sección es presentar la contrastación de hipótesis acorde a los resultados encontrados en el capítulo VIII, cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar, en el capítulo IX donde se aborda el efecto de diferentes fuentes de carbohidratos, en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza y en el capítulo X plantea la aclimatación del portainjerto tolerante al VTC *Citrus volkameriana* mediante la regulación de la intensidad de luz.

11.1 Contrastación de hipótesis

En relación a los resultados donde se evaluó el efecto de los sustratos agrolita, vermiculita y tezontle como sustitutos del agar en la germinación, multiplicación, enraizamiento y supervivencia de plántulas de los portainjertos tolerantes al VTC *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange 35 (C- 35). El porcentaje de germinación, multiplicación y enraizamiento fue de 96–100%, 95-100% y 93-100%, respectivamente en todos los sustratos utilizados al igual que en el agar, observándose una frecuencia de dos brotes por explante en todos los tratamientos. La supervivencia en las plántulas que provenían del medio de cultivo con sustratos inertes (91-100%) en relación a los brotes enraizados con agar (48-51%) fue mayor. Por lo que, los sustratos inertes evaluados pueden sustituir como medio de soporte al agar en el cultivo de tejidos, reduciendo el costo y mejorando la supervivencia de las plántulas.

Por lo tanto, la primera hipótesis particular que propone que: La multiplicación, enraizamiento y supervivencia de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y C- 35 cultivados *in vitro* utilizando agar, agrolita, vermiculita y tezontle son diferentes. No se rechaza.

Con lo que respecta a los resultados obtenidos con los azúcares xilosa, fructosa y 10X20F como sustitutos de la sacarosa en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y C- 35. Además, de la comparación de la vermiculita y el agar como medio de soporte, muestran que en la formación de brotes existió una frecuencia de dos brotes por explante en las tres especies y en todos los azúcares. Por otro lado, la altura de los brotes, número de hojas por brote y número de raíces adventicias en ambos medios utilizados, no mostraron diferencias; observándose un mayor porcentaje de brotes enraizados cuando se utilizó sacarosa y 10X20F en ambos medios de cultivo (99-100%). En relación a los tratamientos con xilosa y fructosa se presentó una respuesta del 75-89% de enraizamiento. Se considera que los azúcares son importantes en el medio de cultivo y la vermiculita puede sustituir como medio de soporte al agar.

Por tanto, la segunda propuesta hipotética que indica que: La multiplicación y enraizamiento de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y C- 35 cultivados *in vitro* empleando los azúcares xilosa, fructosa y la combinación xilosa y fructosa (10X20F) son diferentes. Se rechaza.

Con estos resultados se muestra la importancia de adicionar al medio de cultivo fuentes de carbohidratos que permiten el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los brotes, este hecho pone de manifiesto la relevancia que tiene la sacarosa en el medio de cultivo *in vitro* y abre la posibilidad de usar otros carbohidratos en el medio de cultivo, sin que afecte el desarrollo de los mismos.

En relación a las diferentes intensidades de luz en la supervivencia del portainjerto tolerante al VTC *Citrus volkameriana*, se obtuvo el 100% de supervivencia en aquellas plantas que estuvieron a una intensidad de 350 luz, que fueron enraizadas en vermiculita y se transplantaron en agrolita y suelo, comparados con las plántulas que fueron colocadas en agrolita y suelo que provenían del medio de cultivo solidificado con agar (98%). Por otro lado, cuando se sometieron a 700 luz se obtuvo 52-81% de supervivencia y a 1050 luz se obtuvo 28-54% de supervivencia, en ambos

sustratos. El efecto del sustrato inerte vermiculita en el medio de cultivo *in vitro*, demostró que se puede sustituir como medio de soporte al agar, además combinado con una intensidad de luz baja y una humedad relativa alta inicial incrementó la supervivencia de las plántulas.

En ese sentido, el planteamiento hipotético de que: La supervivencia del portainjerto *Citrus volkameriana* cultivado *in vitro* con agar y vermiculita es diferente a intensidades de 350, 700 y 1050 luz durante la aclimatación. No se rechaza.

Finalmente y acorde a la contrastación de hipótesis planteadas conjuntamente con los resultados obtenidos se puede aseverar que: la adición de sustratos inertes al medio de cultivo no afecta la multiplicación ni el enraizamiento *in vitro* de los brotes; además incrementan la supervivencia de plántulas, durante la etapa de aclimatación combinados con una intensidad de luz baja.

XII. CONCLUSIÓN GENERAL

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que los sustratos agrolita, vermiculita y tezontle son una alternativa para la sustitución del agar en el medio de cultivo, e incrementan la supervivencia de plántulas hasta el doble en relación al agar.

La respuesta similar de xilosa, fructosa y la combinación xilosa y fructosa (10X20F) durante la multiplicación, enraizamiento de los portainjertos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y Citrange- 35 cultivados *in vitro*, indica que cualquiera de estas fuentes de carbono puede ser utilizada en sustitución de la sacarosa.

La intensidad de 350 luz es la mas adecuada para la supervivencia del portainjerto *Citrus volkameriana* cultivado *in vitro*, siendo una alternativa de aclimatación de plántulas enraizadas *in Vitro*.

La combinación de la intensidad de luz, el sustrato vermiculita y la humedad relativa fueron determinantes en la supervivencia de plántulas.