



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

**Propagación por organogénesis directa
empleando segmentos nodales del patrón
Citrange carrizo**

Autores

Br. Wilmer Josué Blandón Flores
Br. Ruslan Martín Alemán Aguirre

Asesores

M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga
M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona

Presentado a la consideración del honorable tribunal
examinador como requisito final para optar al grado
de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Octubre, 2023

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Miembros del Comité Evaluador

Grado académico y nombre
Presidente

Grado académico y nombre
Secretario

Grado académico y nombre
Vocal

Lugar y fecha: Managua, Nicaragua, 10 de octubre de 2023

DEDICATORIA

Primeramente, a **DIOS**, por haberme permitido llegar hasta este punto ya que sin su gracia y bendición no hubiese podido concluir mi carrera, brindándome salud, sabiduría, inteligencia fortaleza y conocimientos para lograr mi objetivo. “Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas” Josué 1:9.

A mis padres, **Jairo Blandón Calderón** y **Santa Ana Flores Vázquez**, quienes, con sacrificio, amor, esfuerzo me apoyaron incondicionalmente en esta etapa para poder lograr mi meta y objetivo de llegar a ser ingeniero agrónomo y una mejor persona.

A mis hermanos, **Dariana Isamar Blandón Flores** y **Jairo José Blandón Flores**, por su constante apoyo en mi formación académica.

Finalmente, a mi abuela, **Prudencia Calderón Chávez** y a mis tíos, **Martha Merari Blandón Calderón**, **Surama Blandón Calderón**, **Ever Blandón Calderón**, **Ramón Blandón Calderón**, **Elvin Blandón Calderón**, **Bismarck Rodríguez** y **César Mendoza** quienes me han apoyado en esta etapa incondicionalmente.

Br. Wilmer Josué Blandón Flores

AGRADECIMIENTO

A **DIOS**, que gracias a él fue posible la realización de nuestro estudio investigativo. “Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora” Eclesiastés 3:1.

A mis asesores, **M.Sc. Marbell Danilo Aguilar** y **M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona** por la confianza, dedicación, esmero y orientación en la conducción de este trabajo investigativo.

A mi Alma Máter, la **Universidad Nacional Agraria**, en especial a los docentes de la **Facultad de Agronomía** por haberme facilitado los medios necesarios para alcanzar mi formación profesional durante estos 5 años de estudio.

A la **Dirección de Investigación y Posgrado (DIEP)** de la **Universidad Nacional Agraria** por financiarnos y brindarnos la oportunidad de desarrollar este estudio investigativo.

Al **Lic. Rene Vado**, que con su apoyo, sugerencias y comentarios proporcionados al momento de la ejecución de cada una de las etapas de nuestro estudio.

Br. Wilmer Josué Blandón Flores

DEDICATORIA

A **DIOS**, nuestro señor por haberme brindado salud, sabiduría y entendimiento además de permitirme seguir adelante en mis estudios y poder culminarlos con éxito en esta nueva etapa de mi vida profesional.

De manera muy especial a mi adorado hijo **Noah Martín Alemán Paizano** quien es el que me impulsa a asumir con responsabilidad los retos y metas que se me presentan en mi vida.

A mi querida madre **Nolvia Aguirre** por brindarme de su gran apoyo moral y económico, ya que gracias a su maravillosa confianza logre salir adelante en mis estudios.

A mi amada esposa **Tania Teresa Paizano Rocha** madre de mi hijo, quien ha sido un pilar fundamental en mi vida, por brindarme su amor, confianza y apoyo tanto como económico y moral para así poder seguir adelante en mi día a día y poder culminar con éxito mi etapa de universitario.

A mis hermanos **Erick Alemán Aguirre** y **Margarita Alemán Aguirre** por su apoyo incondicional durante toda mi etapa universitaria.

Br. Ruslan Martín Alemán Aguirre

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a **Dios** sobre todas las cosas por haberme brindado la oportunidad de elegir esta profesión tan importante en mi vida, por brindarme sabiduría y entendimiento, por darme salud, energía y los deseos de superación para así lograr culminar mis estudios universitarios.

Agradezco de manera muy especial a mi madre **Nolvia Aguirre**, a mi esposa **Tania Teresa Paizano Rocha** quienes me apoyaron con sus valiosos consejos orientándome en el propósito correcto de mi vida, por mostrarme lo conveniente en la realidad en la que vivo. Por su apoyo incondicional económicamente y emocional.

A nuestros asesores **M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** y **M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona** que dedicaron gran parte de su tiempo para brindarnos de su ayuda profesional, su disponibilidad y paciencia para orientarnos en la redacción y elaboración de este trabajo, además de su amistad y confianza que nos brindaron a lo largo de este camino.

A la **Universidad Nacional Agraria** siendo esta mi segundo hogar en la que estuve alojado durante todo el periodo de mi carrera, por su bello lugar de aprendizaje y por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo mis estudios y de la misma forma lograr concluirlos de manera exitosa.

Br. Ruslan Martin Alemán Aguirre

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Origen de las especies cítricas	4
3.2 Descripción del patrón Citrange Carrizo	4
3.3 Enfermedades en los cítricos	4
3.4 Métodos convencionales de propagación	5
3.5 Importancia del cultivo <i>in vitro</i> en cítricos	6
3.6 Reguladores de crecimiento.....	7
3.7 Efecto de la composición del medio de cultivo	8
3.8 Estudios de organogénesis directa en Citrus spp	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1 Ubicación del estudio.....	11
4.2 Material biológico.....	11
4.3 Fase de pre-establecimiento.....	12
4.4 Diseño metodológico	13
4.4.1 Ensayo 1. Fase de Establecimiento	13
4.4.2 Ensayo 2. Fase de multiplicación.....	13
4.4.3 Ensayo 3. Fase de enraizamiento	14

4.5	Manejo del ensayo y metodología	14
4.6	VARIABLES EVALUADAS	15
4.6.1	Ensayo 1. Fase de establecimiento	15
4.6.2	Ensayo 2. Fase de multiplicación	15
4.6.3	Ensayo 3. Fase de enraizamiento.....	16
4.7	Análisis de los datos	16
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1	Ensayo 1. Fase de establecimiento.....	17
5.2	Ensayo 2. Fase de multiplicación	21
5.3	Ensayo 3. Fase de enraizamiento	26
5.3.1	Respuesta rizogénica con dos combinaciones de auxinas	26
5.3.2	Efecto de la sacarosa en el proceso rizogénico	30
VI.	CONCLUSIONES	34
VII.	RECOMENDACIONES	35
VIII.	LITERATURA CITADA	36

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de establecimiento de varetas del cultivar Citrange carrizo	13
2.	Variantes de medios de cultivo que se utilizaron en la fase de multiplicación de brotes	13
3.	Variantes de medios de cultivo con diferentes adiciones de auxinas en la fase de enraizamiento de brotes	14
4.	Diferentes concentraciones de sacarosa utilizados en la fase de enraizamiento de brotes	14
5.	Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP, GA ₃ y AIA en el patrón Citrange carrizo, en fase de establecimiento	17
6.	Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP y GA ₃ en cinco variantes de medios de cultivo en Citrange carrizo, en la fase de multiplicación a las cuatro semanas	22
7.	Efecto de tres concentraciones de ANA e IBA en Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas	27
8.	Cuadro 8. Efecto de cinco dosis de sacarosa en el desarrollo de raíces en el patrón Citrange carrizo	30

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	a. Banco de germoplasma del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) en finca “El Plantel”, (UNA). b. Plantas madres del cultivar Citrange carrizo.	11
2.	Figura 2. Izquierda varetas del patrón Citrange carrizo. Derecha. Cuarto de crecimiento con luz natural.	12
3.	Número de brotes desarrollados en los segmentos nodales de Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas.	18
4.	Porcentaje de callos del patrón Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	18
5.	Brotes con afectación de defoliación en el patrón Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas.	19
6.	Defoliación en el patrón Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	19
7.	Porcentaje de plantas con tallo vigoroso en el patrón Citrange carrizo, en la fase de multiplicación a las cuatro semanas producidas por la adición de 6-BAP y GA ₃ . Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	23
8.	Brotes con tallos vigoroso en el patrón Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las cuatro semanas.	23
9.	Formación de callos en Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las cuatro semanas producidas por la adición de 6-BAP y GA ₃ . Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	24
10.	Brotes axilares del patrón de cítrico Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las cuatro semanas de crecimiento en frascos de vidrio en medio de cultivo semisólido.	26
11.	Porcentaje de defoliación del patrón Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas, producidas por la adición de ANA y AIB. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	27

INDICE DE FIGURA

FIGURA		PÁGINA
12.	Porcentaje de callo del patrón Citrange carrizo, en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas, producidas por la adición de ANA y AIB. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	28
13.	Plantas del patrón de cítrico Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de crecimiento en tubos de ensayos con soporte de papel en medio líquido.	28
14.	Porcentajes de defoliación y de callos en plantas del patrón Citrange carrizo por efecto de las concentraciones de 30, 35, 40, 45 y 50 g L ⁻¹ de sacarosa en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas. Medias con letras desiguales entre diferentes barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p>0.05$.	31
15.	Plantas del patrón de cítrico Citrange carrizo en tubos de ensayos medio gelificado en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas.	32
16.	Plantas del patrón Citrange carrizo en fase de enraizamiento a las cuatro semanas: a) formación de callo en la base. b: plantas con raíces.	32

RESUMEN

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de cultivo de tejidos perteneciente a la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12.5 carretera panamericana norte Managua, Nicaragua y se realizó entre los meses de agosto del 2022 a julio de 2023 con el objetivo de evaluar en (*Citrus* spp.) la propagación por organogénesis directa en el patrón Citrange carrizo en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento. En la fase de establecimiento las variables longitud del brote principal, número de hojas y número de raíces tuvieron buena respuesta estadística en el tratamiento que contenía 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de GA₃, aunque el brote principal presentó el 25% de formación de callo y el 45% de defoliación. En la fase de multiplicación las variables longitud del brote principal, número de brotes axilares y número de hojas respondieron favorablemente a la combinación de 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃, además los brotes axilares presentaron un crecimiento vigoroso y bajos porcentajes de deformación de callos. En la fase de enraizamiento la combinación de 1.00 mg L⁻¹ de ANA con 1.00 mg L⁻¹ de AIB fue mejor la respuesta estadística de las variables longitud de la planta y número de raíces, además la formación de callo y la defoliación presentaron bajos porcentajes. Con la adición de 40 g L⁻¹ de sacarosa se logró mejor respuesta estadística en las variables longitud de planta, número de hojas y menor porcentaje de defoliación, mientras que la variable número de raíces resultó significativamente superior con la adición de 35 g L⁻¹ de sacarosa. Adiciones de 40, 45 y 50 g L⁻¹ de sacarosa favoreció la producción de callos en las plantas con porcentajes entre el 55 y el 85%.

Palabras claves: Medios de cultivo, reguladores de crecimiento, 6-BAP, AIB, ANA

ABSTRACT

The study was developed in the tissue culture laboratory belonging to the National Agrarian University (UNA), km 12.5 North Pan-American Highway Managua, Nicaragua and was carried out between the months of August 2022 to July 2023 with the objective of evaluating in (*Citrus* spp.) propagation by direct organogenesis in the Carrizo Citrange rootstock in the establishment, multiplication, and rooting phases. In the establishment phase, the variables length of the main shoot, number of leaves and number of roots had a good statistical response in the treatment containing 2.00 mg L⁻¹ of 6-BAP with 0.50 mg L⁻¹ of GA₃, although the main shoot presented 25% callus formation and 45% defoliation. In the multiplication phase, the variables length of the main shoot, number of axillary shoots and number of leaves responded favorably to the combination of 2.00 mg L⁻¹ of 6-BAP with 0.50 or 1.00 mg L⁻¹ of GA₃, in addition to the axillary shoots presented vigorous growth and low percentages of callus deformation. In the rooting phase, the combination of 1.00 mg L⁻¹ of ANA with 1.00 mg L⁻¹ of AIB was the best statistical response for the variables plant length and number of roots, in addition, callus formation and defoliation presented low percentages. With the addition of 40 g L⁻¹ of sucrose, a better statistical response was achieved in the variables of plant length, number of leaves and lower percentage of defoliation, while the variable number of roots was significantly higher with the addition of 35 g L⁻¹ of sucrose. Additions of 40, 45 and 50 g L⁻¹ of sucrose will affect the production of callus in the plants with percentages between 55 and 85%

Keywords: Culture media, growth regulators, 6-BAP, AIB, ANA

I. INTRODUCCIÓN

“El origen de los cítricos se localiza en Asia Oriental, en una zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China Meridional, Indonesia, Tailandia, Malasia e Indochina” (González y Tullo, 2019, p. 17). “Estos cultivares ampliamente distribuidos a nivel mundial, tienen un alto valor económico y medicinal” (Hernández *et al*, 2013, p. 181 – 182).

“Los cítricos se ven afectados por la incidencia de plagas y enfermedades, que ha disminuido las producciones en numerosas plantaciones” (Hernández *et al.*, 2013, p. 185).

“En Nicaragua, genera 24,5 millones de dólares anuales, está a cargo de 11, 077 productores, en una superficie aproximada de 21,100 hectáreas, generando 4,000 empleos directos y 5,000 indirectos” (Lacayo, 2013, párrafo 9).

“El patrón Citrange carrizo (*Poncirus trifoliata* X *Citrus sinensis*), es una excelente opción para reducir el efecto del Virus Tristeza de los Cítricos (VTC) que ocasiona la muerte fisiológica de árboles de naranja, mandarina y toronja cuando son injertados en naranjo agrio. Tiene como ventaja inducir una mayor producción de fruta, respecto del agrio, se puede establecer en suelos arcillosos, alcalinos o ligeramente ácidos y que el contenido de calcio no sea superior al 8.5%. Otra ventaja, es que presenta una excelente compatibilidad con casi todos los cultivares de naranja y toronja y con algunos de mandarina” (Chavéz, 2016, p. 128).

“Las enfermedades transmisibles por injerto de los cítricos producidas por virus, viroides, algunas bacterias, micoplasmas y fitoplasmas producen daños económicos importantes en la mayoría de las zonas productoras. En general causan en los árboles declinación fisiológica, pérdida de vigor y vida comercial corta, disminución de la producción, baja calidad de la fruta, restringen el uso de muchos patrones y en varios casos causan la muerte de los árboles. En consecuencia, pueden convertirse en los factores limitantes más importantes de la producción. El control de estas enfermedades sólo puede hacerse con medidas preventivas, en las que es imprescindible usar plantas sanas en las nuevas plantaciones” (Navarro y Juárez, 2005, p. 6).

Zamora *et al.*, (2015) afirman:

En la citricultura es el Huanglongbing conocido como “HLB, una enfermedad sistémica devastadora en los cítricos, causada por tres especies de α -proteobacterias restringidas al floema que se denominan *Candidatus* (Ca.) *LiberAIBcter* (L.) asiaticus, americanus y

africanus (con acrónimos CLas, CLam y CLaf, respectivamente), se diseminan por los insectos vectores *Diaphorina citri* Kuwayama y *Trioza erythrae* y a través del injerto de yemas infectadas. La distribución del patógeno en las plantas enfermas es irregular, por lo que la frecuencia de obtención de plantas con HLB, a partir de la propagación de yemas de una planta infectada, nunca es del 100%. No existen métodos curativos para la enfermedad HLB, siendo el manejo integrado regional es la única solución disponible para el control de esta. Este manejo incluye medidas de cuarentena, uso de yemas certificadas, eliminación de fuentes de inóculo y control de los vectores, entre otras (parr. 2).

Existen técnicas biotecnológicas que permiten obtener materiales, rejuvenecidos y libre de plagas y enfermedades como es cultivo *in vitro*. “La obtención de plantas mediante micropropagación involucra una serie de etapas o fases que abarcan desde los procedimientos previos al establecimiento de los cultivos en forma aséptica, los que se encargan de la selección y manejo de la planta madre, el establecimiento mismo, la proliferación o multiplicación a través de subcultivos periódicos, el enraizamiento, que puede realizar *in vitro* o *ex vitro*, hasta la aclimatación del material obtenido y su trasplante a condiciones de campo” (Cruz, 2012, p. 4).

Tomando en consideración la importancia de propagar material vegetal libre de plagas y enfermedades y de estrategias que contribuyan a la reproducción masiva de patrones de cítricos, con la siguiente investigación se pretende desarrollar un protocolo para la micropropagación del patrón *Citrango carrizo* mediante la técnica organogénesis directa en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar en el patrón de cítrico Citrange carrizo el efecto de diferentes reguladores de crecimiento y de un compuesto orgánico en la micropropagación por organogénesis directa.

2.2 Objetivos específicos

Determinar en la fase de establecimiento la mejor respuesta morfológica que presenten segmentos nodales por efecto de la adición de 6-BAP, GA₃ y AIA.

Definir en la fase de multiplicación el efecto del 6-BAP y GA₃ en segmentos nodales de acuerdo con la respuesta de las variables evaluadas.

Identificar en la fase de enraizamiento la mejor respuesta de las variables evaluadas por efecto de los reguladores de crecimiento ANA y AIB adicionados solos o combinados.

Definir en la fase de enraizamiento la mejor respuesta de las variables evaluadas por efecto cinco concentraciones de la sacarosa.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Origen de las especies cítricas

“Los Cítricos pertenecen a la familia de las Rutáceas. Las especies más cultivadas del género *Citrus* son: las Naranjas dulces *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Naranjas agrios *Citrus aurantium* L., Mandarinas *Citrus reticulata* Blanco, Pomelos *Citrus paradisi* Macf, Limas ácidas *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing., Limones verdaderos *Citrus limón* (L.), Cidras *Citrus medica* L., Toronjas *Citrus máxima* (L.)” (González y Tullo, 2019, p. 17).

3.2 Descripción del patrón Citrange Carrizo

“Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Es un híbrido de la naranja trifoliada y son intermedios entre naranja agria y Citrumelo en términos de vigor, tamaño de fruto, rendimiento total y la adaptabilidad al suelo. Son tolerantes a la tristeza, pero susceptibles a exocortis, al nemátodo de los cítricos y la alcalinidad del suelo y presentan menos resistencia al frío. No afecta la calidad interna de la fruta e induce un mayor tamaño del fruto” (Orduz, *et al.*, (2009) citado por Centeno y Muñoz (2023).

3.3 Enfermedades en los cítricos

A nivel global la producción cítrica ha sido afectada en cuanto a la reducción de la producción y los cambios que han tenido material genético de patrones y variedades que son sensibles o tolerantes a factores bióticos o abióticos. Gonzales (2017) realizó una investigación donde explica cuáles pueden ser los causantes de esta crisis presente en la citricultura:

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), causa una de las enfermedades más dañinas y devastadoras. Se transmite a través de diferentes especies de pulgones, destacando los pulgones marrones (*Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, *Toxoptera aurantii* y *Aphis spiraecola*). El CTV se originó Malasia y países de Asia sudoriental, se dispersa por el traslado del material vegetal. (p. 21).

La Gomosis, provocada por el ataque de diversos hongos (*Phytophthora parasítica* y el *Phytophthora citrophthora*). La mayoría de los patrones y variedades son susceptibles a esta enfermedad, pero con la ingeniería genética se está utilizando determinados patrones capaces de tolerar la enfermedad. (p. 23).

La exocortis ha disminuido su presencia debido al establecimiento de programas de saneamiento y certificación. Su agente causal es el viroide de la exocortis de los cítricos, que pertenece al género *Pospiviroid*. Los patrones sensibles a este agente son el limero Rangpur, el *Poncirus trifoliata* y sus híbridos (citranges Troyer y Carrizo), así como algunas variedades de limoneros y pomelos. Esta enfermedad apareció como causa de la reestructuración de la citricultura tradicional, al sustituir como patrón al naranjo amargo, sensible a la tristeza, por patrones tolerantes a esta pero sensible a la exocortis, su forma de propagación es por yemas portadoras, sin vector. (p. 24).

Enverdecimiento de los cítricos, conocido como Huanglongbing (HLB), causado por la bacteria del género *Candidatus Liberibacter* spp, es una enfermedad destructiva y no se conocen métodos efectivos para su control y no existen variedades comerciales o portainjertos resistentes. Los insectos vectores son la *Diaphorina citri* y *Trioza erytraeae*. (p. 24).

3.4 Métodos convencionales de propagación

Los métodos convencionales para la propagación de cítricos se basan en la selección de yemas y el injerto de variedades de vástago. Para la preparación de portainjertos se utilizan esquejes enraizados, o más frecuentemente propagación de semillas nucelares. (Barlass y Skene, 1986).

La propagación vegetativa de plantas mediante esquejes de tallos es el método más utilizado para produciendo plantas herbáceas y leñosas en muchas partes del mundo. De acuerdo con la consistencia de los tejidos utilizados para propagar se pueden clasificar de la siguiente manera: corte de madera dura, corte de madera semidura, corte de madera blanda esquejes y esquejes herbáceos. Se han utilizado esquejes de tallos para la propagación vegetativa de varios árboles frutales, incluidos los cítricos. Singh and Singh (2018).

Los métodos de propagación vegetativa como esquejes, brotación, injertos, acodos, etc. pueden ser practicados para producir plantas fieles al tipo que tengan características deseables de la planta madre. El injerto de yemas es un método rápido y eficaz para la propagación de especies cítricos (Hartmann y Kester, 1997).

Los cítricos presentan ciertas características comunes: la gran mayoría son plantas de follaje perennifolio, con espinas; hojas de diferente tamaño con peciolo alado y frutos típicos que se

conocen comúnmente como hesperidios. Dentro de las particularidades que poseen los cítricos está la de poder cruzarse entre sí, lo que le ha permitido en condiciones naturales formar híbridos que posteriormente fueron tomados como especies. Además, los cítricos poseen buena afinidad entre sus especies para injertarse entre ellas. (Orduz, 2000).

3.5 Importancia del cultivo *in vitro* en cítricos

Las técnicas de cultivos de tejidos constituyen una de las aplicaciones prácticas más importantes de la biotecnología para la obtención de grandes volúmenes de material vegetal a partir de un ápice (explante), así como la conservación y el intercambio de germoplasma constituyen importantes aplicaciones de estas técnicas (Vuylsteke y de Langhe, 1985; Grisales, 1994) (Citados Chavarría y López, 2010, p. 2).

El término cultivo de tejidos vegetales (CTV) involucra diferentes técnicas, como cultivo de órganos o células vegetales. El CTV Consiste en regenerar plantas a partir de ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen, cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica *in vitro*. (Cedres y Sharry, 2015, p. 8).

Hay reportes de varios informes sobre la organogénesis a partir de diferentes tipos de explantes de cítricos y portainjertos de cítricos. Las respuestas morfogénicas de los cítricos cultivados *in vitro* están influenciadas por el genotipo, el tipo de explante y el medio de cultivo. (Barlass y Skene, 1986)

Las plantas propagadas por cultivo *in vitro* tienen ciertas ventajas tales como: entran en producción antes que las plantas propagadas convencionalmente, lo que es muy importante para mejorar la plantación (Smith y Hamill, 1989; Robinson y Anderson, 1991) (Citado por Chavarría y López, 2010, p. 2).

Varios autores han considerado la micropropagación como una herramienta factible para obtener material rejuvenecido, además consideran lo siguiente:

Facilita transferir al campo material más sano, libre de plagas y enfermedades, disponer de material de siembra en cualquier época del año, multiplicar aceleradamente

genotipos deseables, transportar fácilmente los propágulos, uniformar las plantaciones, obtener cosechas más precoces y mayores producciones (Sobalvarro y Maradiaga, 2015, p. 1).

Se pueden obtener plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Navarro, 2019, p. 1). “Las plantas que resultan propagadas son idénticas a la planta madre y entre sí, en otras palabras, son consideradas como clones” (Méndez *et al.*, 2020, p. 36).

3.6 Reguladores de crecimiento

Starrantino y Caruso, (1987) destacan que el uso de reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos de cítricos es de fundamental importancia. Se han realizado muchos estudios para identificar la composición óptima del medio para cultivos de callos, diferenciación de yemas, brotes y raíces, y regeneración de plantas en cítricos. Las citoquininas y las auxinas son los dos reguladores del crecimiento vegetal más importantes utilizados para controlar la organogénesis y la embriogénesis.

Pérez (2013) afirmó que las fitohormonas son de gran importantes en toda la estructura de la planta:

Participan como reguladores químicos en el crecimiento de la planta, produce sustancias químicas determinados por tejidos de la planta y transportadas a otros tejidos, provocando una respuesta fisiológica, en pequeñas dosis. (p. 9).

Además, estas fitohormonas se clasifican en cinco grupos básicos dependiendo del origen y la respuesta que provocan: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Pero las más utilizadas son las auxinas y citocininas, ya que son las encargadas de regular procesos de crecimiento y división celular, formación de callo y brotación (p. 10).

Canales (2022), sugiere que los “compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, influyen en el crecimiento y el desarrollo de las plantas y se encuentran presentes en muy pequeñas cantidades. Además, afirma que existe tres categorías que son de importancia en todos los procesos *in vitro*:

Citoquininas. Son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, las más comunes y sintéticas son la kinetina (Kinetina: 6-furfunil aminopurina) y BAP (N-6- bencilaminopurina o N6- benciladenina), siendo esta última la más eficaz y comúnmente utilizada en la regeneración de patrones de cítricos. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas (1^{-10} uM L⁻¹) pueden inducir la formación de vástagos adventicios e inhibir la formación de raíces. También promueven la formación de vástagos axilares, disminuyendo la dominancia apical, y retardando el envejecimiento. El nivel de citoquinina usada en el medio es crítico para la regeneración de yemas, debido a que altas concentraciones pueden resultar tóxicas en la organogénesis de algunos genotipos. (p. 13).

Giberelinas. La más difundida es el GA₃ o ácido giberélico, actualmente se conocen más de 90 giberelinas diferentes, encontrándose en una misma planta solo algunas de ellas. Estas hormonas provocan el alargamiento celular, eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla mediante la inducción de la producción de la α -amilasa, inducen la floración de plantas, pueden también eliminar la dormancia de las yemas, inducir la elongación de los entrenudos, el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. Generalmente se usa en concentraciones que van de 0.01 a 1.00 mg L⁻¹, con un punto óptimo de alrededor de 0.10 mg L⁻¹. (p. 13).

Auxinas. La auxina predominante es el ácido indolacético (IAA), encontrándose comúnmente en regiones de crecimiento activo como los meristemos apicales, permiten el crecimiento y formación de raíces, siendo la concentración óptima para promover elongación de tallos está entre 10^{-6} y 10^{-5} M, pero a su vez esta concentración retarda el crecimiento de raíces; así mismo permite la abscisión de órganos, diferenciación vascular, dominancia apical, entre otros. (p. 14).

3.7 Efecto de la composición del medio de cultivo

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, tejidos, protoplastos, anteras, y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micropropagación entre otros (Arrieta y Rico, 2005, p. 34).

Pérez-Tornero (2010), declara que existen diversos trabajos de micropropagación que han demostrado que los explantes de variedades y patrones de cítricos cuyas respuestas morfológicas *in vitro* están fuertemente influenciados por el genotipo, edad y tipo de explante y composición del medio de cultivo. Además, afirma que el medio de cultivo juega un papel muy importante en los protocolos de micropropagación, ya que aporta los nutrientes esenciales para el crecimiento del explante y los reguladores del crecimiento para su desarrollo y diferenciación.

“El balance de los reguladores del crecimiento juega un papel esencial en cada una de las etapas del ciclo de micropropagación. En la fase de multiplicación, la adición de citoquininas Bencil Adenina (BA), es la más usada en estudios de proliferación en cítricos. En cambio, el GA₃, promueve la multiplicación de los nuevos brotes y por otro estimula su elongación. Durante la fase de enraizamiento las auxinas tienen un papel primordial. La elección de una auxina, en una concentración específica, va a depender del genotipo. Si bien para algunos autores la adición de ANA, en combinación con AIB, resulta fundamental para la diferenciación de las raíces y la elongación de estas, pero para otros el AIB parece ser más eficaz que ANA en el proceso de rizogénesis” Canales (2022).

3.8 Estudios de organogénesis directa en *Citrus spp*

Martínez-Hernández *et al.*, (2009), evaluaron el efecto de los azúcares xilosa y fructosa, como sustitutos de la sacarosa en el número y altura de los brotes (AB), número de hojas (NH), número de raíces (NR) por brote, número de brotes enraizados de los portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) *Citrus volkameriana*, Citrumelo swingle y C-35. En la formación de brotes se pudo observar que existió un promedio de 2 brotes por explante en las 3 especies con todas las fuentes de carbohidratos. En AB, NH por brote y NR se observó mayor porcentaje de brotes enraizados cuando se utilizó sacarosa (100%). En relación con los tratamientos con xilosa y fructosa se presentó una respuesta del 75-89% de enraizamiento.

Chávez *et al.*, (2011), realizaron una investigación enfocada en “lograr la formación de brotes del limón criollo (*Citrus limon*) vía organogénesis”. Evaluaron el efecto del picloram (0.00; 0.02; 0.05 y 0.10 mg L⁻¹) y el 2,4-D (0.00; 0.10; 0.50 y 1.00 mg L⁻¹) en la formación de callos y órganos a partir de cotiledones. Obtuvieron un 100% de formación de callos con la adición de

picloram al medio de cultivo, independientemente de la concentración de éste. Con la aplicación de 0.10 mg L⁻¹ de 2,4-D se obtuvo 44.40 % de brotes 33.30 % de hojas y un 55.50 % de raíces”.

Medina (2012), Estudió “el cultivo de mandarina, por ser un árbol con propiedades nutricional y medicinal. Con la técnica de cultivo *in vitro*, garantiza una metodología para complementar los programas de mejoramiento genéticos. Diversas estrategias de regeneración han sido establecidas para estos propósitos. Estas se basan principalmente en el cultivo de brotes apicales, microesquejes, epicotílos y germinación de semillas. El desarrollo de técnicas biotecnológicas ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de cítricos. Con la organogénesis permitió la regeneración de órganos novo a partir de pequeños grupos celulares meristemáticos. Este proceso ocurrió directamente del explante, con la formación previa de callo y después la formación de la planta”.

Vidal (2014), realizó una investigación con el objetivo de desarrollar una metodología para establecer segmentos nodales de lima ácida *in vitro* y evaluar el efecto de citoquininas en la formación de brotes axilares. Los tratamientos correspondieron de la siguiente manera, al medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0.25 mg L⁻¹ de BAP; 0.25 mg L⁻¹ de kinetina; 0.25 mg L⁻¹ de BAP con 0.25 mg L⁻¹ de kinetina y un testigo sin hormonas. Los mejores resultados corresponden al medio MS suplementado con 0.25 mg L⁻¹ de BAP que obtuvo 78% de explantes con brote y un promedio de dos brotes por explante y el medio suplementado con 0.25 mg L⁻¹ de BAP con 0.25 mg L⁻¹ de kinetina que dio 70% de explantes con brote y un promedio de 1.40 brotes por explante logrando establecer segmentos nodales de lima ácida.

La sacarosa en el medio nutritivo es esencial para el desarrollo de una planta *in vitro*, debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono por la planta. Esto se relaciona con la concentración de CO₂ en la atmósfera del tubo de ensayo, la cual no es siempre la más adecuada y con una iluminación de fuente artificial que probablemente resulte insuficiente. (Lihua *et al*, 2019, p.63).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de cultivo de tejido de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el Km. 12 ½ carretera norte en el departamento de Managua. El periodo de ejecución de la investigación se inició en agosto del 2022 hasta julio del 2023

4.2 Material biológico

Para el desarrollo del presente trabajo se obtuvo material genético del banco de variedades de cítricos de OIRSA localizado en Finca “El Plantel-UNA”. Las varetas se obtuvieron de rebrotes ortotrópicos de plantas madre adultas. (Figura 1).



Figura 1. a. Banco de germoplasma del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) en finca “El Plantel”, (UNA). b. Plantas madre en fase adulta del cultivar Citrange carrizo.

El corte de las varetas se realizó con una tijera de podar que constantemente se sumergieron en una solución de cloro comercial al 1%. Así mismo las varetas se introdujeron en frascos de vidrio de 1 litro conteniendo agua con detergente comercial donde permanecieron hasta su traslado a las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA).

4.3 Fase de pre-establecimiento

La cantidad de material vegetal necesario que se utilizó para establecer los experimentos fueron 40 varetas del patrón Citrange carrizo. Una vez que el material vegetativo se llevó al laboratorio de cultivo de tejidos se procedió a eliminar la solución acuosa (detergente comercial con agua) en que se encontraban las varetas y se procedió a realizarles enjuagues continuos para eliminar los residuos de polvo y suciedad. Posteriormente las varetas se sumergieron nuevamente en una solución acuosa, con un tiempo de inmersión de 30 minutos, transcurrido ese periodo de tiempo se les realizó tres enjuagues con agua del grifo y se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se realizó la transferencia.

Dentro de la cámara de flujo laminar, las varetas fueron sumergidas en benomil diluido en agua destilada estéril a razón de 3.00 g L^{-1} durante 20 minutos y transcurrido ese tiempo se efectuaron tres enjuagues continuos con agua destilada estéril. Finalmente, las varetas se introdujeron en una solución de cloro comercial al 1% durante un tiempo de exposición de 10 minutos y luego se procedió a eliminar los residuos de cloro de los tejidos con tres enjuagues con agua destilada estéril.

Finalizado el proceso de desinfección de las varetas, se procedió a realizar los cortes individuales de los segmentos nodales sobre platos de aluminio con ayuda de pinzas y hojas de bisturí estériles (Figura 2. Izquierda). Estos tejidos se introdujeron de forma individual en tubos de ensayo de vidrio que contenían los medios de cultivos con sus tratamientos específicos. Concluida la siembra de los segmentos nodales, las gradillas que contenía los tubos de ensayos con los tejidos se llevaron al cuarto de crecimiento en condiciones de luz natural donde se expusieron a un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 de oscuridad con 2000 lux de intensidad. (Figura 2. Derecha).



Figura 2. Izquierda varetas del patrón Citrange carrizo. Derecha. Cuarto de crecimiento con luz natural.

4.4 Diseño metodológico

4.4.1 Ensayo 1. Fase de Establecimiento

Las varetas desinfectadas se inocularon en un medio que contenía las sales Murashige y Skoog (MS) al 100 %, tiamina 100 mg L⁻¹, inositol 100 mg L⁻¹, phytagel 2.50 g L⁻¹ con pH 5.7, sacarosa 3%. Las variantes estudiadas son combinaciones de citoquinina (6- bencilaminopurina (6 -BAP) y dos auxinas ácido giberélico (GA₃) y ácido indol acético (AIA). (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de establecimiento de varetas de del cultivar Citrange carrizo

Tratamientos	6-BAP* (mg L ⁻¹)	GA ₃ ** (mg L ⁻¹)	AIA *** (mg L ⁻¹)
T ₀	0.00	0.00	0.00
T ₁	2.00	0.00	0.00
T ₂	2.00	0.50	0.00
T ₃	2.00	1.00	0.00
T ₄	2.00	0.00	0.50
T ₅	2.00	0.00	1.00

* 6-Bencil amino purina, **Ácido giberélico, ***Ácido indolacético

4.4.2 Ensayo 2. Fase de multiplicación

El medio de cultivo conteniendo las combinaciones de reguladores de crecimiento que se indican en el Cuadro 2, además del inositol 100 mg L⁻¹, 2.5 g L⁻¹ de agar y 30 g L⁻¹ de sacarosa. En todos los casos se ajustó el medio a un pH de 5.7 ± 1.

Cuadro 2. Variantes de medios de cultivo que se utilizaron en la fase de multiplicación de brotes

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	6-BAP*	GA ₃ **
T ₁	2.00	0.00
T ₂	2.00	0.50
T ₃	2.00	1.00
T ₄	2.00	1.50
T ₅	2.00	2.00

* 6-Bencil amino purina, **Ácido giberélico

4.4.3 Ensayo 3. Fase de enraizamiento

Se realizaron dos experimentos en esta fase. Uno correspondió a la siembra en un medio que contiene las sales de Murashige y Skoog más las combinaciones de los reguladores de crecimiento a estudiar, dos dosis de ácido indol butírico (AIB) y una dosis de ácido naftalenacético (ANA) con un total de tres tratamientos (Cuadro 3). Cada tratamiento conformado por 30 segmentos nodales con ± 1 cm de longitud.

Cuadro 3. Variantes de medios de cultivo con diferentes adiciones de auxinas en la fase de enraizamiento de brotes

Tratamientos	Reguladores de Enraizamiento (mg L ⁻¹)	
	ANA*	AIB**
T ₁	1.00	0.00
T ₂	1.00	0.50
T ₃	1.00	1.00

* Ácido nastalanacético, **Ácido indolbutírico

En el segundo experimento se evaluaron cinco dosis de sacarosa en un medio que contenía las sales de Murashige y Skoog (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diferentes concentraciones de sacarosa utilizados en la fase de enraizamiento de brotes

Tratamientos	Sacarosa (g L ⁻¹)
T ₁	30
T ₂	35
T ₃	40
T ₄	45
T ₅	50

4.5 Manejo del ensayo y metodología

En el ensayo 1. Los segmentos nodales una vez sembrados individualmente en tubos de ensayo con dimensiones de 10 x150 mm que contenían un volumen de 10 ml de medio gelificado con los componentes descritos en el acápite 4.4.1. Al finalizar el proceso de siembra de los segmentos nodales dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a trasladarlos al cuarto de crecimiento.

En cuanto a el área de crecimiento, el primer ensayo se mantuvo en oscuridad a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 2 semanas para la inducción de brotes, transcurrido este período se trasladaron a condiciones 12 luz y 12 de oscuridad natural e igual temperatura por 2 semanas.

El ensayo 2. El material obtenido del ensayo 1, se separaron los brotes y se inocularon en frascos de vidrio de 8 onzas que se le agregaron 20 ml de medio de cultivo gelificado y posteriormente se sembraron 20 yemas por tratamiento y variedad. En cada frasco se inocularon cinco brotes axilares. El ensayo se mantuvo en el cuanto de crecimiento en condiciones de 12 luz y 12 de oscuridad y temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 4 semanas,

En el ensayo 3. Se realizaron dos experimentos con segmentos nodales, el primero consistió en el estudio con las auxinas AIB y ANA adicionadas solas o combinadas, los tejidos se establecieron en tubos de ensayo que contenían un volumen de 10 ml de medio líquido con soporte de papel filtro y se sembró un brote por tubo de ensayo. El segundo experimento consistió en evaluar a las cuatro semanas la respuesta rizogénica por el efecto de la sacarosa adicionada al medio de cultivo en cinco concentraciones de sacarosa. Las condiciones ambientales en que permanecieron los tejidos fueron similares a la descrita en el ensayo 2 antes descrito.

4.6 Variables evaluadas

4.6.1 Ensayo 1. Fase de establecimiento

A las cuatro semanas posteriores a la siembra se evaluaron las siguientes variables:

- ✓ Longitud del brote principal (cm)
- ✓ Número de brotes axilares
- ✓ Número de hojas
- ✓ Porcentaje de callos
- ✓ Porcentaje de defoliación

4.6.2 Ensayo 2. Fase de multiplicación

La evaluación se realizó a las cuatro semanas de establecido el ensayo 2 y las variables son las siguientes:

- ✓ Longitud del brote principal en cm.

- ✓ Número de brotes axilares
- ✓ Número de hojas
- ✓ Porcentaje de formación de callos
- ✓ Porcentaje de plantas con tallo vigoroso

4.6.3 Ensayo 3. Fase de enraizamiento

En este ensayo la evaluación se realizó siguiendo el procedimiento de toma de datos del ensayo 3 y las variables que se tomaron en cuenta, son las siguientes:

- ✓ Longitud del brote principal (cm).
- ✓ Número de raíces
- ✓ Número de hojas
- ✓ Porcentaje de defoliación
- ✓ Porcentaje de plantas con callo

4.7 Análisis de los datos

A los datos obtenidos de las variables longitud del brote principal, número de brotes axilares y número de hojas se les realizó el análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se practicó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller $\alpha = 0.05$. Los datos de porcentaje de defoliación y formación de callos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre tratamientos con la prueba de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con 5 tratamientos y un testigo absoluto, 20 observaciones por cada tratamiento con un total de 120 segmentos nodales. Para el procesamiento de datos se empleó el paquete estadístico INFOSTAT 2020, versión libre (InfoStat/L).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ensayo 1. Fase de establecimiento

A las cuatro semanas en los segmentos nodales la variable la longitud de yema principal presentó medias respectivas de 0.64 y 0.82 cm en los tratamientos testigo y en el tratamiento que se le adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP que únicamente resultaron estadísticamente inferiores al tratamiento que contenía 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ que obtuvo una media de 1.44 cm, pero resultó con igual respuesta estadística a las medias logradas en los tratamientos que se les adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 1.00 mg L⁻¹ de GA₃, 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de AIA y 2 mg L⁻¹ de 6-BAP con 1.00 mg L⁻¹ de AIA con medias respectivas de 1.77, 0.88 y 0.91 cm.

En número de brotes axilares las medias de 2.40 y 2.30 obtenidas en los tratamientos sin adiciones de reguladores de crecimiento y el tratamiento con 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP superaron significativamente a las medias de 1.20, 1.35 y 1.05 obtenidas en los tratamientos que se les adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 1.00 mg L⁻¹ de GA₃, 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de AIA y 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 1.00 mg L⁻¹ de AIA respectivamente (Figura 3).

La variable número de hojas con media de 3.65 obtenida en el tratamiento que se le adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ resultó significativamente superior a las medias de 1.50, 1.35 y 1.65 que se obtuvo en los tratamientos que no se le adicionaron reguladores del crecimiento y a los que se les adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de AIA respectivamente. Los resultados se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP, GA₃ y AIA en el patrón Citrange carrizo, en fase de establecimiento

Tratamientos	Reguladores de crecimiento			Variables evaluadas		
	6-BAP* (mg L ⁻¹)	GA ₃ ** (mg L ⁻¹)	AIA*** (mg L ⁻¹)	Longitud de brote principal	Número de brotes axilares	Número de hojas
T ₀	0.00	0.00	0.00	0.64 b	2.40 a	1.50 b
T ₁	2.00	0.00	0.00	0.82 b	2.30 a	1.35 b
T ₂	2.00	0.50	0.00	1.44 a	1.90 ab	2.10 ab
T ₃	2.00	1.00	0.00	1.17 ab	1.20 b	3.65 a
T ₄	2.00	0.00	0.50	0.88 ab	1.35 b	1.65 b
T ₅	2.00	0.00	1.00	0.91 ab	1.05 b	3.10 ab

* 6-Bencil amino purina, **Ácido giberélico, ***Ácido indolacético. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0.05)



Figura 3. Número de brotes desarrollados en los segmentos nodales de Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas.

En la variable porcentaje de callos no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias obtenidas en el tratamiento testigo que no contenía reguladores de crecimiento y los tratamientos que se le adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de AIA con porcentajes respectivos de 5, 10 y 10%, aunque resultaron inferiores significativamente a los tratamientos que contenían 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ y 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ que les correspondieron porcentajes del 25 y 40%. Los resultados se presentan en la Figura 4.

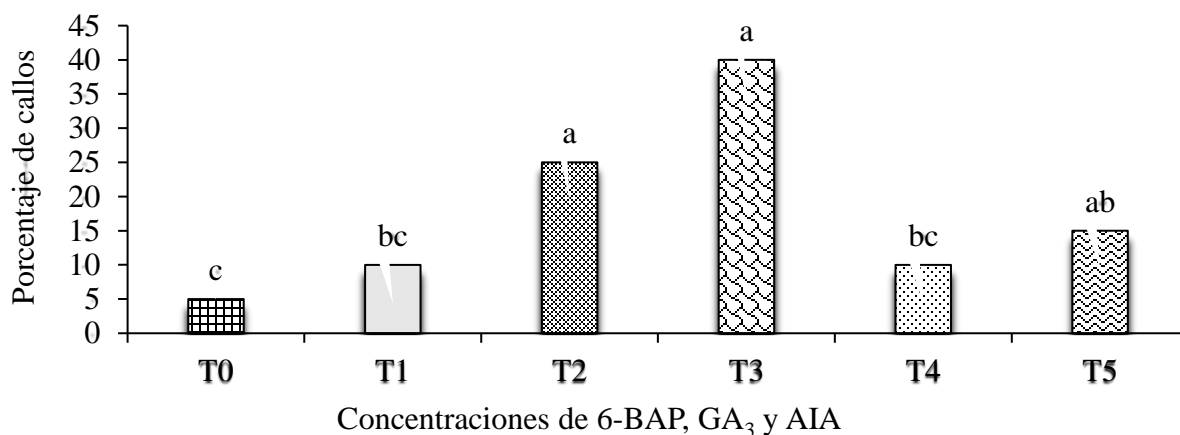


Figura 4. Porcentaje de callos del patrón Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p > 0.05$.

La defoliación se presentó en las plantas que se formaron en todos los tratamientos en diferentes porcentajes de acuerdo con el tipo de regulador de crecimiento y a la concentración que se adicionó al medio de cultivo (Figura 5). No se presentaron diferencias estadísticas entre las medias obtenidas en el tratamiento que no contenía reguladores de crecimiento y los tratamientos que se le adicionaron solo 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ con medias respectivas de 5, 35 y 45%, estos porcentajes resultaron significativamente inferiores a los tratamientos que contenían 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP combinado con 0.50 de mg L⁻¹ de GA₃ o con 1.00 de mg L⁻¹ de AIA con promedios porcentajes respectivos de 60 y 75%. Los resultados se presentan en la Figura 6



Figura 5. Brotes con afectación de defoliación en el patrón Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas.

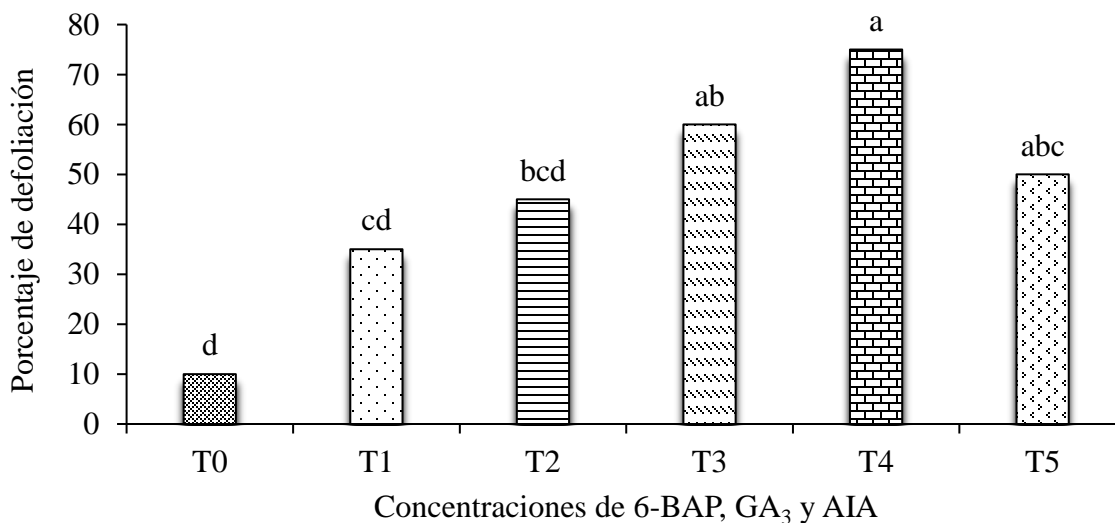


Figura 6. Defoliación en el patrón Citrange carrizo en la fase de establecimiento a las cuatro semanas. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p > 0.05$.

La función de la fase de establecimiento es lograr que el explante en el medio de cultivo induzca el desarrollo de brotes múltiples para la multiplicación posterior (Arrieta y Rico, 2005, p. 33).

La combinación de 2 mg L⁻¹ de 6-BAP con de 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ favorecieron la respuesta de los segmentos nodales en las variables longitud del tallo principal, número de brotes axilares y en el número de hojas y la aparición de plantas que presentaron callos y brotes afectados por la defoliación fue reducida.

Prakash and Sharma (2018) reportan que el establecimiento y la regeneración del explante se ven afectados por un número de factores como tipos de corte, el fotoperiodo, el recipiente de cultivo, la orientación del explante, la temporada de recolección del explante, la combinación hormona, la parte de la planta utilizada como explante y la edad del explante etc.

Dottin (2000) afirma que en *Xanthosoma* spp. que con un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas, ápices o yemas. Por otra parte (Chavarría y López, 2010, p. 13) mencionan que el balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas, presentes en el explante las cuales dependen de la especie y del tipo de explantes.

Pérez (2013), atribuye al BAP la mejora en la eficiencia del proceso de organogénesis porque estimula la regeneración de brotes adventicios en bajas concentraciones (0.50-1.00 mg L⁻¹) e inhibiéndolo a concentraciones más altas (2.00- 4.00 mg L⁻¹).

Rattanpal *et al.*, (2011) observaron que en limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) la formación de yemas aumentó cuando la concentración de BA se incrementó hasta 2.00 mg L⁻¹. Sin embargo, una concentración superior suprimió el número de yemas por explante. La mejor respuesta respecto al número de yemas adventicias formadas por explante se presentó a una concentración de 2.00 mg L⁻¹ de BA agregado con 500 mg L⁻¹ de extracto de malta y 25 g L⁻¹ de sacarosa.

El BAP combinado con AIA o ANA en segmentos nodales de diferentes especies de cítricos (*C. aurantifolia*, *C. mitis*, *C. paradisi* y *C. sinensis*) promovieron la brotación de 1- 9 brotes por explante, atribuyendo que la presencia de ANA induce a la formación de brotes, que el BAP aumenta el número de brotes por explante y que AIA coadyuva al desarrollo de estos. Al-Bahrany (2002) y Marutani-Hert y colaboradores (2011), mencionados por Pérez. 2013, p. 49 y 50).

Pérez-Tornero *et al.*, (2010) valoraron que la adición de AG₃ en el medio de cultivo resultó esencial para la multiplicación óptima de explantes de *Citrus limon*. Además, demostraron que el AG₃ tuvo una influencia más significativa sobre la multiplicación que el 6-BAP.

Desai *et al.*, (2018) determinaron que el tratamiento compuesto de medio WP suplementado con 5 mg L⁻¹ de cloruro de cobalto (CoCl₂) demostró ser muy eficaz en el control de defoliación registrándose un promedio de 3.60 ± 0.86 y brotes desecados de 0.60 ± 0.24 que resultó muy bajo. El mayor número de raíces (5.60 ± 0.74) y longitud de raíces (6.78 ± 0.52 cm) se obtuvo en el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM), suplementado con 200 mg L⁻¹ de carbón activado (CA).

Lamiaa *et al.*, (2020) en experimentos de micropropagación con (*Citrus australasica*) conocida como Australian finger lime encontraron que aplicaciones al medio de cultivo de tiosulfato de plata (STS) con 0.70 μM de GA₃ produjo el mayor número de brotes y evitó la abscisión de las hojas. Con la adición de 60 μM de tiosulfato de plata (TST) al medio de cultivo M.S dio como resultado una micropropagación eficiente de los explantes de lima y una abscisión controlada de las hojas. Actúan como agentes inhibidores del etileno que se acumula dentro del recipiente que contiene los tejidos y además del STS mencionan el nitrato de plata (AgNO₃) y nanopartículas de plata (AgNP) para controlar la abscisión de las hojas y para cultivo de tejidos.

5.2 Ensayo 2. Fase de multiplicación

En la prueba de comparación de medias en la variable longitud del brote principal no se presentaron diferencias estadísticas significativas por efecto de los tratamientos que contenían solamente 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP, 2 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ con medias respectivas 3.42, 3.88 y 4.06 cm. El tratamiento que contenía 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 2.00 mg L⁻¹ de GA₃ con media 2.50 cm resultó significativamente inferior a los demás tratamientos.

En los tratamientos que contenían 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP combinados con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ con medias respectivas de 7.45 y 8.55 superaron significativamente a las medias de 5.94, 5.35 y 5.00 que se lograron en los tratamientos respectivos que contenían solamente 2 mg L⁻¹ de 6-BAP o combinado con 1.50 o 2.00 mg L⁻¹ de GA₃

En cuanto a la variable número de hojas no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre las medias obtenidas en los tratamientos con 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP, 2.00 mg L⁻¹ de 6-

BAP combinado con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ con medias respectivas de 3.69, 3.65, 3.55, estos resultaron significativamente superiores a las medias de 3.10 y 3.05 que se presentaron en los tratamientos con 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP combinado con 1.50 o 2.00 mg L⁻¹ de GA₃ Los resultados se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP y GA₃ en cinco variantes de medios de cultivo en Citrange carrizo, en la fase de multiplicación a las cuatro semanas

Tratamientos	Reguladores de multiplicación		Variables evaluadas		
	6-BAP * (mg/l)	GA ₃ ** (mg/l)	Longitud de brote principal	Número de brotes axilares	Número de hojas
T ₀	2.00	0.00	3.42 ab	5.94 b	3.69 a
T ₁	2.00	0.50	3.88 ab	7.45 a	3.65 a
T ₂	2.00	1.00	4.06 a	8.55 a	3.55 a
T ₃	2.00	1.50	3.15 bc	5.35 b	3.10 b
T ₄	2.00	2.00	2.50 c	5.00 b	3.05 b

* 6-Bencil amino purina, **Ácido giberélico. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0.05).

En el porcentaje de plantas con tallo vigoroso no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes de los tratamientos 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y la combinación de 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ que fueron del 85, 85 y 75% respectivamente. Las medias de los tratamientos que contenían 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP con adiciones de 1.50 o 2.00 mg L⁻¹ de GA₃ con medias respectivas de 45 y 40% resultaron estadísticamente inferiores a las medias que resultaron en los tratamientos con solo 2 mg L⁻¹ de 6-BAP o combinado con 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 7 y 8).

Rattanpal *et al.*, (2011) en la micropropagación de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) la formación de yemas aumentó cuando la concentración de BA se incrementó hasta 2.00 mg L⁻¹ junto con extracto de malta a razón de 500 mg L⁻¹ y la adición de 25 g L⁻¹ de sacarosa. Sin embargo, una concentración superior suprimió el número de yemas por explante.

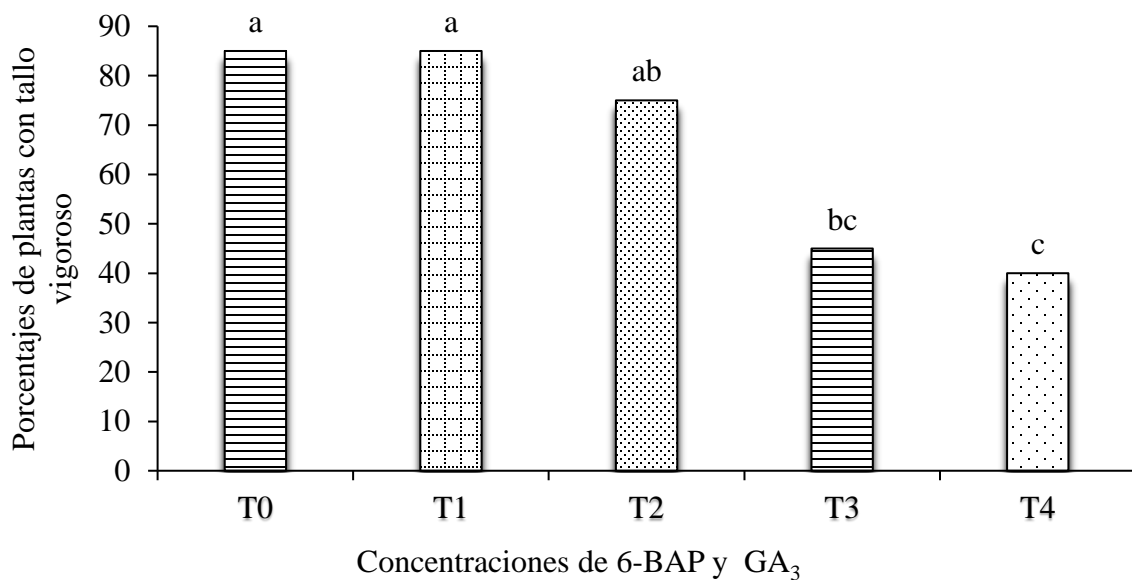


Figura 7. Porcentaje de plantas con tallo vigoroso en el patrón Citrange carrizo, en la fase de multiplicación a las cuatro semanas producidas por la adición de 6-BAP y GA₃. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para p>0.05.



Figura 8. Brotes con tallos vigoroso en el patrón Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las cuatro semanas

En el porcentaje de formación de callos no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias obtenidas en los tratamientos que se le adicionaron solo 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP o combinado con 0.50 y 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ con porcentajes respectivos de 25, 25 y 30%, estos resultados únicamente fueron inferiores al tratamiento que se le adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP combinados con 1.50 y 2.00 mg L⁻¹ de GA₃ con porcentajes respectivos de 70 y 75%. Los resultados se presentan en la Figura 9.

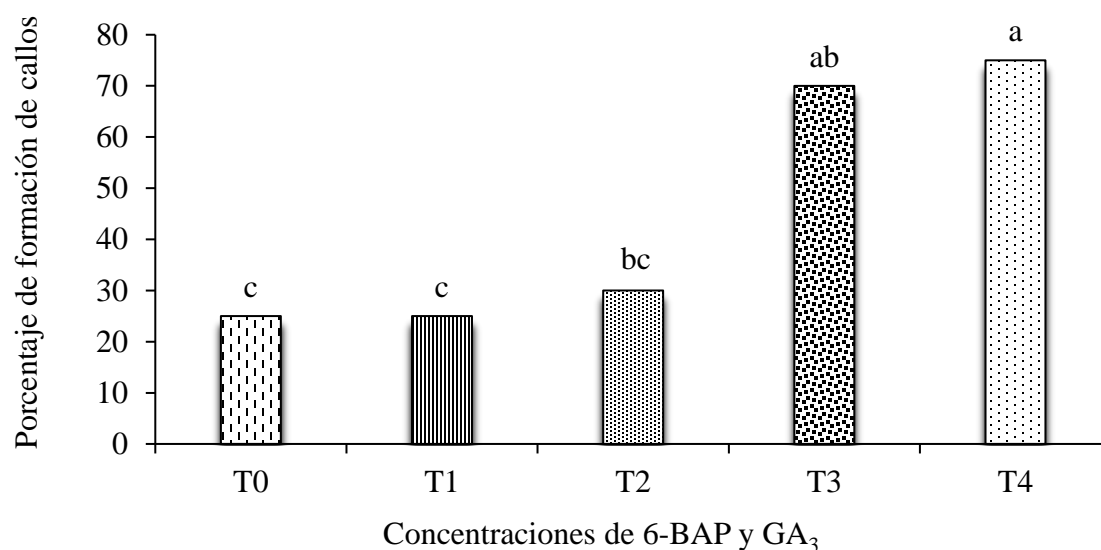


Figura 9. Formación de callos en Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las cuatro semanas producidas por la adición de 6-BAP y GA₃. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para p>0.05.

El balance de los reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, con un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de propagación (Chavarría y López, 2010, p. 19).

En la fase de multiplicación tiene especial importancia la relación citoquinina/ auxina, que varía dependiendo del método de multiplicación elegido (Figura 10). Para la inducción de brotes adventicios se recomiendan concentraciones moderadas de ambas hormonas, sin embargo, para el desarrollo de yemas axilares son necesarias altas concentraciones de citoquininas, añadiéndose a menudo bajas dosis de auxina, que, aunque no mejoren las tasas de multiplicación, si mejoran el crecimiento de los brotes (Murashige, 1974; Hu y Wang, 1983) (Castro y Maradiaga, 2015, p. 18).

En el presente estudio se determinó que con la adición de concentraciones de 2 mg L⁻¹ de 6-BAP combinadas con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃ se obtuvo buena respuesta estadística en las medias de las variables longitud del brote principal, número de brotes axilares y en número de hojas, además se obtuvieron porcentajes entre el 75 y el 85% de plantas vigorosas y plantas con formación de callos entre el 25 y el 30%.

Aunque las citoquininas son necesarias para estimular la división celular y promover la proliferación de brotes, se necesitan precauciones ya que los niveles altos de citoquinina pueden inhibir el alargamiento, número creciente de brotes cortos (Kadota y Niimi 2003).

Pérez *et al.*, (2021). determinaron las condiciones para la multiplicación *in vitro* de la especie *Citrus aurantium* en el primer y segundo subcultivo. En el primer subcultivo los mejores resultados se lograron con BAP en concentración de 1.00 mg L⁻¹ con promedio de 8.13 segmentos nodales. En el segundo subcultivo los mejores resultados se lograron en los tratamientos con BAP a razón de 0.50 y 1.00 mg L⁻¹ con valores entre 7.63 y 7.10 segmentos nodales.

Arrieta y Rico (2017), experimentando con otros reguladores de crecimiento lograron en la fase de multiplicación durante 1 mes presentaron un mayor desarrollo del brote que aquellos que se sembraron en el medio Murashige & Skoog suplementado con diferentes concentraciones de ANA y kinetina y sus respectivas combinaciones. Sin embargo, entre estos últimos el tratamiento 3 (0.00 ANA y 2.00 mg L⁻¹ de kinetina) permitió el mayor crecimiento del brote.

Al-Bahrany (2001) quien realizó experimentos en lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) a diferentes concentraciones de BAP obteniendo como resultado óptimo las concentraciones de 0.25 a 0.50 mg L⁻¹, esta respuesta positiva se debe a que el BAP estimula la división celular y la formación de brotes adventicios, pero inhibe la formación de raíces.

Hernández *et al.*, (2021), En la fase de multiplicación *in vitro* los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo que contenía 0.25 mg L⁻¹ de los reguladores de crecimiento kinetina, 6-BAP y GA₃. generando 4.70 brotes por explante.



Figura 10. Brotes axilares del patrón de cítrico Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las cuatro semanas de crecimiento en frascos de vidrio en medio de cultivo semisólido.

5.3 Ensayo 3. Fase de enraizamiento

5.3.1 Respuesta rizogénica con dos combinaciones de auxinas

En longitud de la planta no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las medias que presentaron los tratamientos que contenían 1.00 mg L^{-1} de ANA adicionado con 0.50 o 1.00 mg L^{-1} de AIB con medias respectivas de 3.67 y 3.51 cm , estos resultados superaron significativamente a la media de 2.92 cm que se alcanzó en el tratamiento que se le adicionó solo 1 mg L^{-1} de ANA.

En número de hojas se obtuvo una media de 4.27 en el tratamiento con 1.00 mg L^{-1} de ANA con 0.50 mg L^{-1} de AIB resultando significativamente superior a los tratamientos que se les agregaron solo 1.00 mg L^{-1} de ANA o combinado con 1.00 mg L^{-1} de AIB que registraron medias respectivas de 2.60 y 2.73 hojas.

En número de raíces las medias que se alcanzaron en los tratamientos resultaron con diferencias estadísticas significativas que favorecieron cuando al tratamiento se le agregaron 1.00 mg L^{-1} de ANA con 1.00 mg L^{-1} de AIB con media de 2.40 raíces. La segunda categoría estadística favoreció a la media de 1.47 raíces producida en el tratamiento que contenía 1.00 mg L^{-1} de ANA con 0.50 mg L^{-1} de AIB. La última categoría se obtuvo en el tratamiento con media de

0.60 que se le adicionó solamente 1.00 mg L⁻¹ de ANA. Los resultados se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto de tres concentraciones de ANA y AIB en Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas

Tratamientos	Hormonas de enraizamiento		Variables evaluadas		
	ANA (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)	Longitud de la planta (cm)	Número de hojas	Número de raíces
T ₁	1.00	0.00	2.92 b	2.60 b	0.60 c
T ₂	1.00	0.50	3.67 a	4.27 a	1.47 b
T ₃	1.00	1.00	3.51 a	2.73 b	2.40 a

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

De acuerdo con el análisis no paramétrico prueba de Kruskal-Wallis el porcentaje de defoliación se presentó en el 80% de las plantas en el tratamiento que solo se le adicionó 1.00 mg L⁻¹ de ANA, mientras que en el tratamiento que contenía 1.00 mg L⁻¹ tanto de ANA como de AIB el 20% de las plantas presentaron afectación por defoliación y en el tratamiento que contenía 1.00 mg L⁻¹ de ANA con 0.50 mg L⁻¹ de AIB el porcentaje fue del 40% (Figura 11).

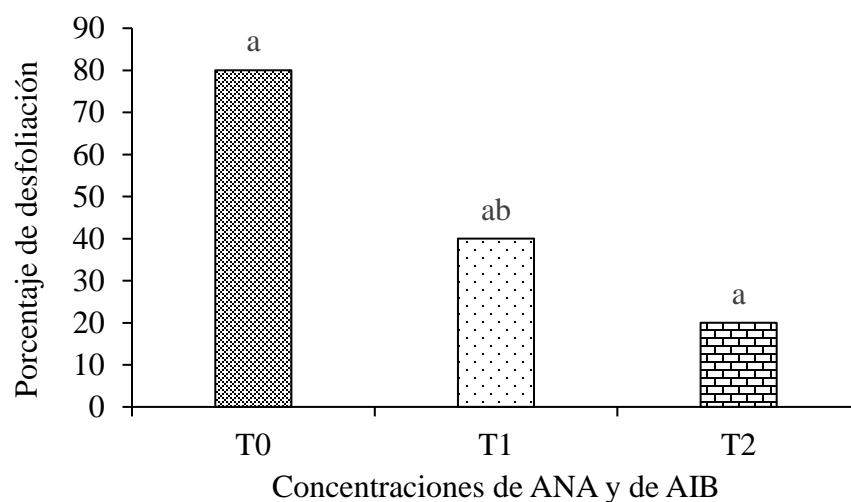


Figura 11. Porcentaje de defoliación del patrón Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas producidas por la adición de ANA y AIB. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p > 0.05$

Los resultados del análisis no paramétrico prueba de Kruskal-Wallis el porcentaje de plantas con callo en el tratamiento que solo se le adicionó 1.00 mg L^{-1} de ANA se presentó en el 80% de las plantas, mientras que en el tratamiento que contenía 1.00 mg L^{-1} de ANA y de AIB el 15% de las plantas presentaron callos y en el tratamiento que contenía 1.00 mg L^{-1} de ANA con 0.50 mg L^{-1} de AIB el porcentaje de afectación por callo fue del 40% (Figura 12).

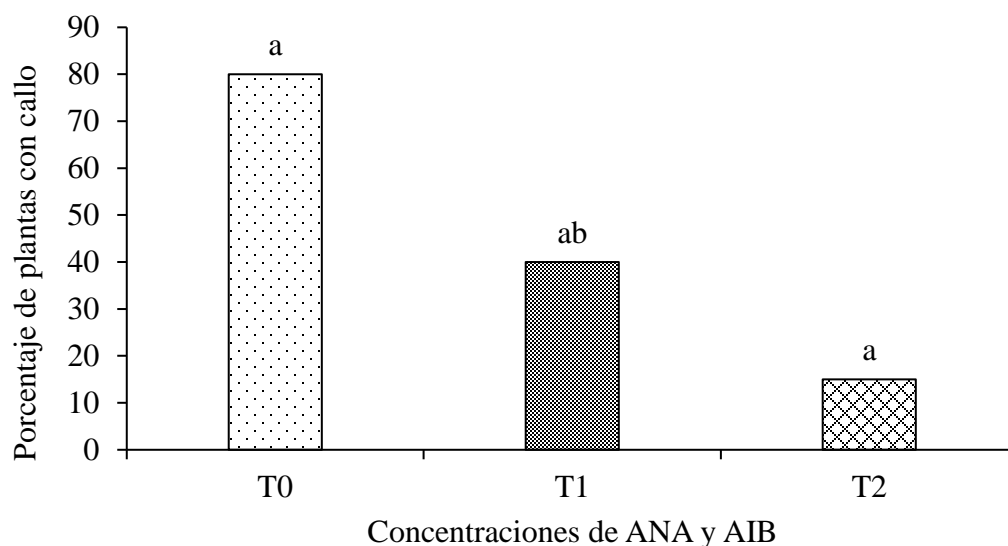


Figura 12. Porcentaje de callo del patrón Citrange carrizo, en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas, producidas por la adición de ANA y AIB. Medias con letras desiguales entre las barras difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p > 0.05$.

En la Figura 13 se presentan plantas de *Citrange carrizo* en la fase de enraizamiento en tubos de ensayos con soporte de papel en medio líquido a las cuatro semanas de crecimiento.



Figura 13. Plantas del patrón de cítrico Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de crecimiento en tubos de ensayos con soporte de papel en medio líquido.

En el presente estudio no se lograron los promedios de número de raíces reportados por Fanta *et al.*, (2016) en las especies de cítricos limón (*Citrus limon*) y *macrophylla* (*Citrus macrophylla*) que adicionado al medio de cultivo 1.00 mg L⁻¹ de ANA en limón obtuvieron 20.30 ± 0.57 como el mejor promedio de número de raíces por brote y en *macrophylla* el mejor promedio fue de 3.70 ± 0.57.

El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido, recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de cultivo de enraizamiento y es precisamente el AIA una de las auxinas más empleadas en esta fase (Vásquez y Tórrez, 1981; Hu y Wang, 1983; Hernández y Rugama, 1998).

Navarro (2019) afirma que el AIA tiene efecto favorable en la emisión de raíces y de acuerdo con los resultados en su estudio su número se incrementó en las variantes de medios de cultivo que contenían mayor concentración de AIA. No obstante, no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos que se les adicionó AIA. (p 15).

Según Orellana (1998) citado (Chavarría y López, 2010, p. 30) la fase de enraizamiento es la fase más voluminosa de todo el proceso pues cada brote, esqueje o yema formado durante la fase de multiplicación debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que crezca y desarrolle un tallo con hojas y desarrolle raíces que le permitan la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato en la fase de aclimatación.

Según Vásquez y Torres y (1991), El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de raíces es bien conocido, recomendándose su empleo en la mayor parte de medios de cultivo en la fase de enraizamiento, siendo el AIA una de las auxinas más usadas. (Chavarría y López, 2010, p. 34).

Arrieta y Rico (2017), experimentando con la concentración de 0.50 mg L⁻¹ de ANA fue la que permitió un mayor grado de enraizamiento a los 28 días de la siembra de los explantes, constituyéndose en el tratamiento el óptimo para la fase de enraizamiento el medio que contenía 1.0 mg L⁻¹ de AIB y de ANA permitiendo obtener 94.7% de explantes enraizados, 23.4 mm de longitud de raíz y 2.20 raíces por explante.

5.3.2 Efecto de la sacarosa en el proceso rizogénico

En longitud de la planta se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las medias que presentaron los tratamientos que contenían 40 gramos de sacarosa con medias respectivas 5.24 cm, estos resultados superaron significativamente a la media de los tratamientos T₁ (4.58), T₂ (4.55) y T₄ (4.33), solamente el T₅ (3.47 cm) no se observó un crecimiento satisfactorio en los brotes de Citrange carrizo.

En número de hojas se obtuvo una media de 5.40 en el tratamiento con 40 gramos de sacarosa, resultando significativamente superior a los tratamientos T₁ (4.55), T₂ (4.35) y T₄ (4.40), nuevamente se observó que el tratamiento con 50 gramos de sacarosa, su resultados no fueron significados en cuanto a la variable estudiada que se obtuvo una media de 3.10.

En número de raíces las medias que se alcanzaron en los tratamientos resultaron con diferencias estadísticas significativas que favorecieron cuando al tratamiento se le agregaron 35 gramos de sacarosa presento una media de 0.95 de raíces. Los demás tratamientos no presentaron diferencia significativa. Los resultados se presentan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Efecto de cinco dosis de sacarosa en el desarrollo de raíces en el patrón Citrange carrizo

Tratamientos	Sacarosa	Variables evaluadas		
		Longitud de la planta (cm)	Número de hojas	Número de raíces
T ₁	30	4.58 bc	4.55 b	0.60 b
T ₂	35	4.55 bc	4.35 b	0.95 a
T ₃	40	5.24 a	5.40 a	0.50 b
T ₄	45	4.33 b	4.40 b	0.30 b
T ₅	50	3.47 c	3.10 c	0.25 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

De acuerdo con el análisis no paramétrico prueba de Kruskal-Wallis el porcentaje de defoliación que se presentó en las plantas en el tratamiento que se le adicionaron 40 g L⁻¹ de sacarosa fue del 10%, mientras que en el tratamiento que contenía 35 g L⁻¹ fue del 15% no hubo diferencia significativa entre ellos. Con la adición de 50 g L⁻¹ de sacarosa la defoliación se presentó en el 40% de las plantas. En cuanto a la formación de callo en los tratamientos que contenían concentraciones sacarosa de 45 y 50 g L⁻¹ presentaron el mayor incremento de formación de callo. (Figuras 14, 15 y 16).

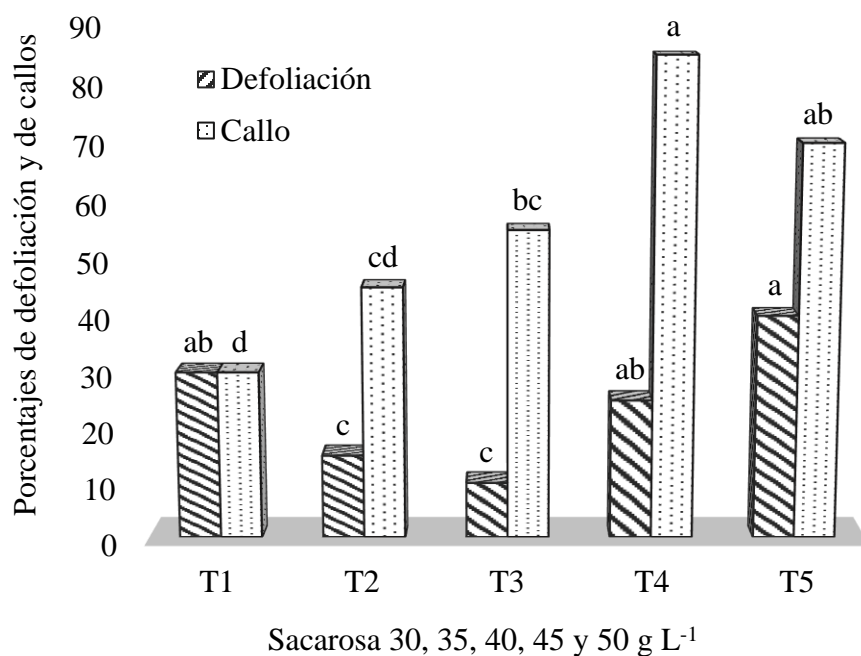


Figura 14. Porcentajes de defoliación y de callos en plantas del patrón Citrange carrizo por efecto de las concentraciones de 30, 35, 40, 45 y 50 g L⁻¹ de sacarosa en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas. Medias con letras desiguales entre las diferentes barras, difieren significativamente según prueba de Kruskal-Wallis para $p > 0.05$.

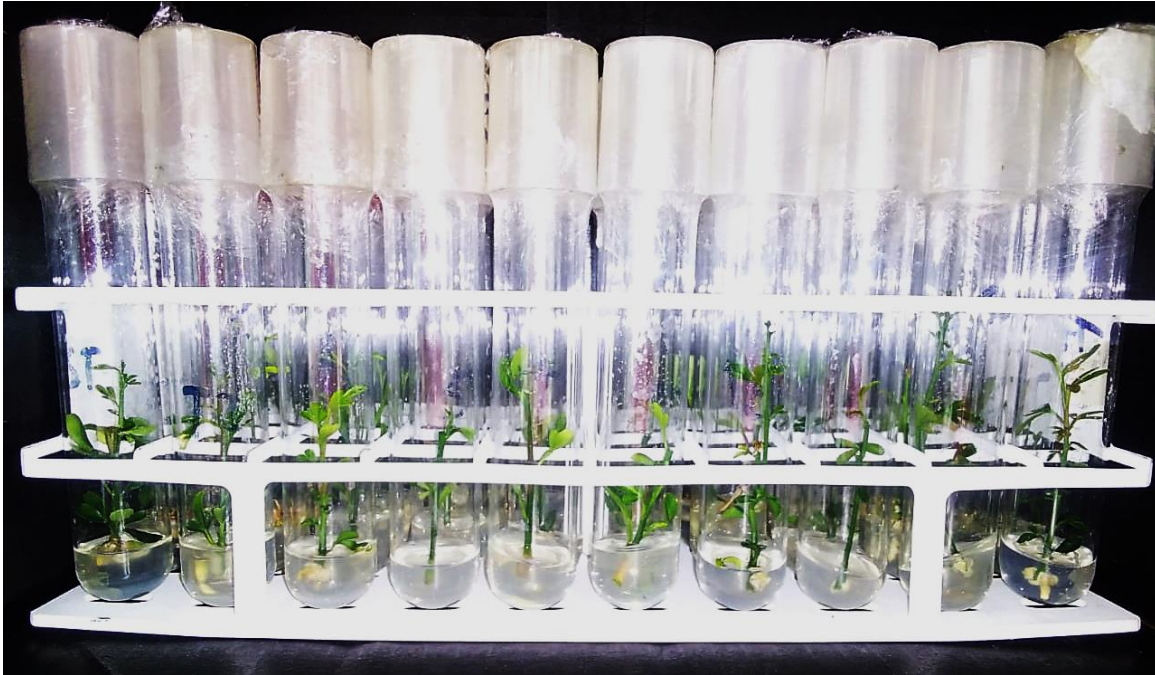


Figura 15. Plantas del patrón de cítrico Citrange carrizo en tubos de ensayos con medio gelificado en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas.



Figura 16. Plantas del patrón Citrange carrizo en fase de enraizamiento a las cuatro semanas: a) formación de callo en la base. b: plantas con raíces.

De Rivero *et al.*, (2005) experimentando con *Anthurium andraeanum* en la fase de enraizamiento obtuvieron la mejor concentración de sacarosa en el medio de cultivo fue de 40 g L⁻¹, observándose que mejoró la altura de las plantas, así como el número y longitud de las raíces para las dos variedades.

Lihua *et al.*, (2019) recomiendan como protocolo de microinjerto óptimo, el uso de 45 g L⁻¹ de sacarosa con un cotiledón en el patrón para el limón Eureka y para el naranjo Washington Navel, la utilización de 45 g L⁻¹ de sacarosa y un patrón sin cotiledones.

VI. CONCLUSIONES

En el patrón de cítrico Citrange carrizo en la fase de establecimiento las variables longitud del brote principal, número de hojas y número de raíces tuvieron buena respuesta estadística en el tratamiento que contenía 2.00 mg L^{-1} de 6-BAP con 0.50 mg L^{-1} de GA_3 . El inconveniente es que los tejidos presentan porcentajes significativos de defoliación y de formación de callo.

En la fase de multiplicación la combinación de 2.00 mg L^{-1} de 6-BAP con 0.50 o 1.00 mg L^{-1} de GA_3 favoreció la expresión de la longitud de brote principal, número de brotes axilares, número de hojas, porcentajes de plantas con tallo vigoroso y menor porcentaje de formación de callos.

En la fase de enraizamiento que contenía 1.00 mg L^{-1} de ANA y 1.00 mg L^{-1} de AIB se obtuvo la mejor respuesta estadística en las variables longitud de planta y número de raíces, pero resultaron menores los porcentajes de formación de callo y de defoliación. La adición de 40 g L^{-1} de sacarosa se logró mejor favoreció la respuesta estadística de las variables longitud de planta, número de hojas y en porcentaje de defoliación y con adición de 35 g L^{-1} de sacarosa la media de número de raíces resultó significativamente superior.

VII. RECOMENDACIONES

Estudiar el efecto en la reducción de la defoliación por la adición a los medios de cultivos de consistencia semi-sólida de productos inhibidores del etileno en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.

Experimentar en la fase de aclimatación con plantas obtenidas en la fase de enraizamiento para evaluar su respuesta al crecimiento y la supervivencia.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar, E. (2021.). Análisis metabólico en tres fenotipos somaclonales de *Agave angustifolia* Haw. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. [Tesis de grado]. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1904/1/PCB_M_Tesis_2021_EDDER%20AGUILAR_MENDEZ.pdf.
- Arrieta, E y Rico, H. (2005). Producción de plántulas de limón criollo (*Citrus aurantifolia*) mediante la técnica de micropropagación *in vitro*. [Tesis de grado, universidad de Sucre]. <https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/handle/001/656/T634.3748%20A775.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Barlass M and Skene KGM (1986). Citrus (Citrus species). In Bajaj YPS (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Trees I, pp 207-219, Springer Verlag, Heidelberg.
- Canales, Herrera, E. (2022). *Evaluación de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento in vitro de Citrus aurantium (L.) "naranja agria" empleando el patrón "Citrumelo"*. [Tesis de Grado, Universidad nacional José Faustino Sánchez CARRIÓN] [.https://repositorio.unjpsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/7140/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unjpsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/7140/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Castro, S y Maradiaga. (2015). Micropropagación tradicional y en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal del cultivar de plátano (*Musa spp.*) CEMSA ¾. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3282/1/tnf02c355.pdf>.
- Cedres, M y Sharry, S. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1.
- Chavarría, D y López, G. (2010). Micropropagación de ápices caulinares en plátano (*Musa spp.* ABB) cultivar cuerno gigante. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf02c512m.pdf>.
- Chaves, J. (s.f). Tecnología de producción en cítricos Citrange carrizo: una opción contra la tristeza de los cítricos. Ficha tecnológica por sistema producto. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/609.pdf>.
- Chávez, J. F y Arboleda, M.L. (2011). Propagación *in vitro* del limón criollo (*Citrus limon*) con el empleo de dos reguladores de crecimiento. [Tesis de pregrado, Universidad técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/779/1/T-UTC-0600.pdf>
- Cortes, Paniagua, R. (2004). Adaptación de la técnica de Microinjertación *in vitro* de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (*Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck*) y Citrumelo (*Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus paradisi Macf.*) [Tesis de maestría Instituto Tecnológico de Costa Rica] Repositorio institucional. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/5629/adaptacion%20de%20la%20Otecnica%20microinjertacion%20in%20vitro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Cruz, Pizarro, F. (2012). Micropropagación: Manual de Practicas. [Universidad Nacional Autónoma de México]. http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/micropropagacion_manualprac.pdf.
- Curti, Díaz, S; Hernández Guerra, C; Lordo Salazar, R. (septiembre – diciembre, 2012). Productividad del limón ‘persa’ injertado en cuatro portainjertos en una huerta comercial de Veracruz, México. Revista Chapingo serie horticultura. 18 (3), 291 – 305. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60926213003.pdf>.
- del Rivero, N; Agramonte, D; P, Barbón, R; Camacho, W y Jiménez, F. (2005). Efecto de la aplicación de AIA y sacarosa en el enraizamiento *in vitro* de las variedades Sonate y Lambada de *Anthurium andraeanum* Lind. Biotecnología Vegetal Vol. 5, No. 2: 89 – 94. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/449/417>
- Desai, Parth; Patil, Ghanshyam; Dholiya, Bhumika; Desai, Shikha; Patel, Fenil and Narayanan, Subhash. (2018). Development of an efficient micropropagation protocol through axillary shoot proliferation for pomegranate variety ‘Bhagwa’. Annals of Agrarian Science. 16. https://www.researchgate.net/publication/325583119_Development_of_an_efficient_micropropagation_protocol_through_axillary_shoot_proliferation_for_pomegranate_variety_%27Bhagwa%27.
- Fanta, M; Menamo, T and Bantte, K. (2016). Horticulture and plant sciences. optimization of sucrose, plant hormones and photoperiod for *in vitro* propagation of lemon (*C. limon*) and macrophylla (*C. macrophylla*) using shoot tip. Advances in life science and technology. P. 31-39. Vol.47. file:///c:/users/tonys/downloads/32302-35195-1-pb%20(1).pdf.
- Gonzales ,Bonillo, D. (2017). *Patrones y Variedades de cítricos: Un recorrido Histórico*. [Tesis de Maestría, Universidad Miguel Hernández de ElChe]. <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/4201/1/TFM%20Gonz%C3%A1lez%20Bonillo%20Daniel.pdf>.
- González, L y Tullo, C. (2019). *Guía técnica del cultivo de cítricos*. https://www.jica.go.jp/paraguay/espanol/office/others/c8h0vm0000ad5gke-att/gt_03.pdf library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf.
- Hartmann, Hudson T.; y Kester, Dale E. (1997). Propagación de plantas. Principios y Prácticas. Quinta impresión. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. ISBN: 968-26-0789-2.
- Hernández, Y; Silva, J y Borges, M. (2013). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. ‘Mexicana’ a partir de semillas. Revista Biotecnología Vegetal. 13 (5)181 – 187. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/116/474>.
- Lacayo, L. (2013). *Cítricos amenazados*. El Nuevo Diario. <http://www.elnuevodiario.com.ni/economia/288686-citricos-amenazados/>.

- Lamiaa, M, Jude, W and Manjul, D. (2020). Silver compounds regulate leaf drop and improve *in vitro* regeneration from mature tissues of Australian finger lime (*Citrus australasica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* (2020). 141:455–464. <https://australianlimes.ifas.ufl.edu/media/australianlimesifasufledu/docs/Silver-compounds-regulate-leaf-drop-and-improve-in-vitro-regeneration-from-mature-tissues-of-Australian-finger-lime.pdf>.
- Llihua, L; Calderón, A y Cabrera, R. (2019). Influencia de sacarosa y cotiledones en la microinjertación de cítricos. *Revista Científica ecuatoriana*, 6 (23) 62-64. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/1071/5/Llihua-et-al_2019_Microinjertaci%C3%B3n_C%C3%ADtricos.pdf.
- Martínez-Hernández, M.J, Alonso López, A, Osorio-Acosta, F, Gallardo López, F, López Moctezuma, H, y Mata Rosas, M. (2009). Evaluación de diferentes fuentes de carbohidratos y medios de soporte, para la multiplicación *in vitro* de portainjertos de cítricos tolerantes a la tristeza. *Agronomía Tropical*, 59(3), 343-350. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000300011.
- Medina, V. (2012) Establecimiento de un sistema de organogénesis *in vitro* en *Citrus reticulata* Blanco a partir de segmentos de hojas y entrenudos. [Tesis de pregrado, Universidad Central de Venezuela]. <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/15775/3/TESIS%20Vanessa%20Medina.pdf>.
- Jiménez, Marco; Caamal, Humberto; Rodríguez Ávila, Norma; Días, Arely; Alamilla Magaña, Juan; Asunción, Criollo. (2020). Avances y limitantes en la micropropagación del limón persa (*Citrus × latifolia* Tan.). *Temas de Ciencia y Tecnología* v. 24(72). <file:///C:/Users/jahiner/Downloads/TESIS%20LIMON%20PERSA/Guia-Normas-APA-7ma-edicion.pdf>.
- Kadota, M. and Y. Niimi (2003). "Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity *in vitro* pear cultivar shoots." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(3): 261-265. file:///C:/Users/Tonys/Downloads/A_1022378511659.pdf.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Navarro, J. (2019). Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) del cultivar CCO6-791 (Tesis de pregrado). <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf02n322.pdf>.
- Navarro, L y Juárez, J. (2005). Microinjerto de ápices caulinares de cítricos *in vitro*. https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/8077/2005_Navarro_Microinjerto.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Prakash, S and Sharma, S (2018). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7 (4): 1513-1517. <file:///E:/Otro%20micropropagac%C3%B3n%20de%20c%C3%ADtricos.pdf>.

- Ordúz, J.O. (2000). El cultivo de los cítricos. Programa Investigación Regional Agrícola. CORPOICA. Pp. 20-29. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19139/44423_57532.pdf
- Pérez, D.R; Arevich, M.B., Carrasco, Y.Y.F & Pupo, J. J. S. (2021). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantium*. Redel. Revista Granmense de Desarrollo Local. 5(3), 288-300. <https://revista.udg.co.cu/index.php/redel/article/download/2702/5290>.
- Pérez Tornero, O y Burgos, L. (2010). Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63, 133–141 (2000). <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006430718024>.
- Pérez, A. (2013). Efecto de precursores y reguladores de crecimiento en la formación de brotes adventicios a partir de explantes de limón persa. [Tesis de grado, Campus Montecillo]. http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/2025/1/Perez_Luna_AI_MC_Fruticultura_2013.pdf.
- Rattanpal HS, Kaur G, Gupta M. (2011). *In vitro* plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) by direct organogenesis. African Journal of Biotechnology. 10 (63) :13724-13728. file:///C:/Users/Tonys/Downloads/ajol-file-journals_82_articles_96804_submission_proof_96804-973-251904-1-10-20131112.pdf.
- Roca, W y Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT (Centro internacional de agricultura tropical). Cali, Colombia. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf.
- Rojas, P. (2001). Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (*VTC*). [Tesis de maestría, Universidad Veracruzana]. <https://www.uv.mx/iif/files/2014/10/TESISPaula-version-final-MC.pdf>.
- Santiana, W. (2014). Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares. [Tesis de grado, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/ffc39c29-c3a6-4322-ad7c-db1f4e0db468/content>.
- Singh, K.K and Singh K.P. (2018). Propagation of citrus species through cutting. Journal of Medicinal Plants Studies. 6(1): 167-172. https://www.researchgate.net/publication/343821316_Propagation_of_citrus_species_through_cutting_A_review.
- Sarrantino, A and Caruso, A. (1987). Experiences on the *in vitro* propagation of some citrus rootstocks. Acta Horticulturae 212:471-478.
- Vanegas, M. J. (2002). *Guía técnica cultivo del limón pérsico*. <http://repiica.iica.int/docs/B0217E/B0217E.PDF>.

- Vázquez, B.E y Torres, S. 1995. Fisiología vegetal. Crecimiento y desarrollo. (ed.) Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana, pp. 317-362.
- Vidal, M. (2014). Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales. [Tesis de grado, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano].
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/9008ae67-f26b-4c5e-8721-93e3ce33a53c/content>.
- Zamora, Rodriguez, V; Pantoja, M; Peña Bárzaga, I; Marchena, X y Hernández Rodriguez, L. (mayo 2015). Uso del microinjerto in vitro de ápices caulinares para eliminar 'Candidatus LiberAIBcter asiaticus' en cultivares de cítricos en Cuba. Revista de Protección Vegetal, 30 (2), 123 - 132.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200006&lng=es&tlng=es.