



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

**Micropropagación en *Citrus* spp. de patrones
Citrange carrizo y Citrumelo swingle en
Biorreactores Económicos de Inmersión
Temporal**

Autores

Br. Samantha José Centeno Sáenz

Br. Emely Alejandra Muñoz Muñoz

Asesores

M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona

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

Managua, Nicaragua
Septiembre, 2023

Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Honorable Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Miembros del Comité Evaluador

Presidente (Ing. Isidro Salinas
Marcenaro)

Secretario (Ing. Harlem Tania
Ríos Peralta)

Vocal (MSc. Donald Juárez Gámez)

Lugar y Fecha: Sala Magna, FAGRO, 20 de septiembre del 2023

DEDICATORIA

Especialmente dedico este trabajo a **Dios** por haberme brindado salud, sabiduría y sobre todo paciencia para poder culminar este gran trabajo.

A mis madres: **Katty Muñoz y Aminta Muñoz** por haberme otorgado la vida y brindarme su apoyo moral y económico en todo momento.

A la directora de la Extensión Cultural MBA **Ana Victoria Borge Medina**, quien me apoyó incondicionalmente desde el primer día que llegue a la universidad, ayudándome tanto en mi formación profesional como artística.

Br. Emely Alejandra Muñoz Muñoz

DEDICATORIA

Lleno de amor, esperanza y sobre todo fe dedico este trabajo importante a mi **Padre Celestial Dios** y a la **Virgencita de Guadalupe** que desde siempre me protegieron y me llenaron de sabiduría, dedicación y amor a mi carrera.

A mis padres, **Guillermo Centeno** y **Flor Eliza Sáenz** porque ellos son la motivación de mi vida, son la razón por la cual estoy culminando mi carrera y cada una de mis metas, dándome apoyo y amor incondicional.

A mis hermanas **Jeril Centeno**, **Wendy Centeno** y hermano **Guillermo Centeno** porque me motivan a cumplir mis metas y siempre me dieron apoyo en mi proceso universitario.

A mis abuelos, **Buenaventura Sáenz** y **Francisca García** que están en el cielo, ellos me enseñaron el amor al campo, a la tierra, llenándome de sabios consejos para la vida.

Es para mi gran satisfacción y orgullo poder dedicarles a ellos que con mucho esfuerzo, esmero y trabajo me lo he ganado.

Br. Samantha José Centeno Sáenz

AGRADECIMIENTO

A mis asesores **M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** y **M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona** por haberme dedicado el tiempo y brindarme el conocimiento y apoyo durante todo el proceso.

A las personas encargadas de las actividades del laboratorio **Ing. Johnston Zeledón Rodríguez** y **Lic. Rene Vado Hernández**, pues nos acompañaron en cada actividad realizada para poder llevar a cabo el estudio.

A mi mejor amiga **Samantha Sáenz**, por su amistad todos estos años; fue un proceso difícil para nosotras llegar hasta el final de nuestro trabajo y siempre nos apoyamos mutuamente confiando en que algún día lo lograríamos.

A la **Universidad Nacional Agraria** por ser mi segundo hogar y haberme enseñado tantas lecciones maravillosas las cuales ayudaron a mi formación tanto profesional como artística.

Br. Emely Alejandra Muñoz Muñoz

AGRADECIMIENTO

El principal agradecimiento a **Dios** y la **Virgen** que me han guiado y dado la fortaleza para seguir adelante.

A mi familia, en especial a mi padre y madre **Guillermo Centeno** y **Flor Eliza Sáenz** que con gran esfuerzo y sacrificio me permitieron poder tener mis estudios universitarios.

A mis tíos **Ramon de Jesús Sáenz** y **Buenaventura Sáenz** que han sido como mis padres y siempre estuvieron al pendiente de mi seguridad y bienestar y me apoyaron de una u otra manera a seguir con mis estudios.

A la **Universidad Nacional Agraria** por haberme aceptado ser parte de ella y permitirme estudiar mi carrera.

Br. Samantha José Centeno Sáenz

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINAS
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURA	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
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 de patrones	4
3.3 Importancia del uso de patrones en cítricos	5
3.4 Importancia del cultivo in vitro en cítricos	6
3.5 Efecto de la composición del medio de cultivo	7
3.6 Reguladores de crecimiento	8
3.7 Sistemas de inmersión temporal	11
3.8 Efecto de la densidad de inoculación de tejidos en BEIT	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Ubicación del estudio	13
4.2 Selección de material genético	13
4.3 Diseño de la investigación, diseño experimental y diseño de tratamientos	14
4.3.1 Fase de multiplicación	14
4.3.2 Fase de enraizamiento	16
4.4 Manejo del ensayo y metodología	17
4.4.1 Ensamblaje del sistema de inmersión BEIT	17
4.4.2 Establecimiento del estudio	17
4.5 Datos evaluados	18

4.5.1 Experimento 1. Multiplicación de segmentos nodales	18
4.5.2 Experimento 2. Efecto de la densidad de siembra	19
4.5.3 Experimento 3. Efecto de las auxinas en la rizogénesis	19
4.6 Análisis de los datos	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1 Experimento 1. Multiplicación de segmentos nodales	20
5.1.1 Patrón Citrange carrizo	20
5.1.2 Patrón Citrumelo swingle	21
5.2 Experimento 2. Efecto de la densidad de siembra	25
5.2.1 Patrón Citrange carrizo	25
5.2.2 Patrón Citrumelo swingle	27
5.3 Experimento 3. Efecto de las auxinas en la rizogénesis	31
5.3.1 Patrón Citrange carrizo	31
5.3.2 Patrón Citrumelo swingle	33
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	38
VIII. LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Variantes de medios de cultivo que se utilizaron en la fase de multiplicación de segmentos nodales de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle en biorreactores BEIT	17
2.	Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento de brotes en los segmentos nodales de patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle	19
3.	Variables de longitud del brote principal, número de brotes y número de hojas del brote principal del segmento nodal del patrón Citrange carrizo a las cuatro semanas de evaluadas	20
4.	Variables de longitud del brote principal, número de brotes y número de hojas del brote principal del patrón Citrumelo swingle a las cuatro semanas de evaluadas	22
5.	Efecto del IBA y ANA en variables de longitud de planta, número de brotes y número de hojas segmentos nodales del patrón Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de evaluadas	32
6.	Efecto del IBA y ANA en variables de longitud de planta, número de brotes y número de hojas de segmentos nodales del patrón Citrumelo swingle en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de evaluadas	34

ÍNDICE DE FIGURAS...

FIGURA		PÁGINA
1.	Banco de germoplasma del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) en finca “El Plantel”, (UNA).	13
2.	Plantas madres. Izquierda: Citrange carrizo. Derecha: Citrumelo swingle.	14
3.	Izquierda: varetas extraídas de las plantas madres de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle. Derecha: brotación de yema axilar de segmento nodal a las 4 semanas del establecimiento.	15
4.	Crecimiento in vitro de patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle a partir de yemas axilares. a y b) planta y segmento nodal de Citrange carrizo. c y d) planta y segmento nodal e Citrumelo swingle	16
5.	Izquierda: Brotes axilares del patrón Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las dos semanas de crecimiento en BEIT. Derecha: Brotación axilar a las cuatro semanas.	21
6.	Izquierda: Brotes axilares del patrón Citrumelo swingle en la fase de multiplicación a las dos semanas de crecimiento en BEIT. Derecha: Brotación axilar a las cuatro semanas.	22
7.	Variable longitud del brote principal del patrón Citrange carrizo evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.	26
8.	Variable número de brotes del patrón Citrange carrizo evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.	26
9.	Variable número de hojas del patrón Citrange carrizo evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.	27
10.	Brotación axilar del patrón de Citrange carrizo en la fase de multiplicación con densidades de siembra de: a) 20 segmentos nodales. b) 30 segmentos nodales c) 40 segmentos nodales a las cuatro semanas de crecimiento en BEIT del litro.	27
11.	Variable longitud del brote principal del patrón Citrumelo swingle evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.	28
12.	Variable número de brotes axilares del patrón Citrumelo swingle evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
13	Variable número de hojas del patrón Citrumelo swingle evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.	29
14.	Brotación axilar del patrón Citrumelo swingle en la fase de multiplicación con densidades de siembra de: a) 20 segmentos nodales. b) 30 segmentos nodales c) 40 segmentos nodales a las cuatro semanas de crecimiento en BEIT.	29
15.	Porcentaje de plantas con raíces del patrón Citrange carrizo a las cuatro semanas. Barras con letras distintas difieren significativamente según prueba Kruskal Wallis, para $p > 0.05$.	33
16.	Izquierda: Planta del patrón Citrange carrizo en fase de enraizamiento a las cuatro semanas. Derecha: Plantas en BEIT a las seis semanas.	33
17.	Porcentaje de plantas con raíces del patrón Citrumelo swingle a las cuatro semanas. Barras con letras distintas difieren significativamente según prueba Kruskal Wallis, para $p > 0.05$.	35
18.	Izquierda. Planta del patrón de Citrumelo swingle en fase de enraizamiento a las cuatro semanas. Derecha. Plantas en BEIT a las seis semanas.	35

RESUMEN

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12.5 carretera panamericana norte Managua, Nicaragua entre los meses de agosto del 2022 a mayo de 2023 con el objetivo de evaluar en *Citrus* spp. patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle en las fases de multiplicación y enraizamiento en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) de un litro. En la fase de multiplicación en el patrón Citrange carrizo los segmentos nodales respondieron favorablemente en número de brotes en el tratamiento que contenía 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ con media de 5.18 brotes, superando a la media de brotes axilares obtenidos en el tratamiento que se adicionó solamente 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y el 6-BAP combinado con 1.50 y 2.00 mg L⁻¹ de GA₃ con medias correspondientes de 2.80, 3.86 y 3.65 brotes. En patrón Citrumelo swingle el tratamiento con 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0.50 mg L⁻¹ de GA₃ presentó una media de 6.00 brotes que superó estadísticamente a la media de 4.40 brotes obtenida en el tratamiento que solo contenía 6-BAP. La densidad de siembra de los segmentos nodales en los dos patrones solamente presentó diferencias estadísticas en la variable número de hojas, superando la media de densidad con 40 segmentos nodales a la densidad con 20 segmentos. En la fase de enraizamiento el patrón Citrange carrizo obtuvo el mejor resultado en el tratamiento que contenía 2.00 mg L⁻¹ de IBA de acuerdo con las variables longitud de planta, número de hojas y porcentaje de plantas con raíces con medias respectivas de 3.28 cm, 3.85 y 60%; mientras que en el patrón Citrumelo swingle la mejor respuesta se logró en el tratamiento que contenía 2.00 mg L⁻¹ de ANA con medias de longitud de planta de 3.21 cm, número de hojas 2.10 y el 60% de plantas con raíz.

Palabras claves: segmentos nodales, sistema de inmersión temporal, reguladores de crecimiento, organogénesis directa

ABSTRACT

The study was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the National Agrarian University (UNA), km 12.5 North Pan-American Highway Managua, Nicaragua between the months of August 2022 to May 2023 with the objective of evaluating (*Citrus* spp.) Carrizo citrange and Swingle citrumelo rootstocks in the multiplication and rooting phases using one-liter Economic Temporary Immersion Bioreactors (BEIT). In the multiplication phase in the Carrizo citrange pater, the nodal segments responded favorably in number of shoots in the treatment containing 2.00 mg L⁻¹ of 6-BAP with 0.50 mg L⁻¹ of GA₃ with an average of 5.18 shoots, exceeding the average of axillary shoots obtained in the treatment with only 2.00 mg L⁻¹ of 6- BAP and also when 6-BAP was combined with 1.50 and 2.00 mg L⁻¹ of GA₃ with corresponding means of 2.80, 3.86 and 3.65 shoots. The Swingle citrumelo rootstock, the treatment with 2.00 mg L⁻¹ of 6-BAP and 0.50 mg L⁻¹ of GA₃, presented a mean of 6.00 shoots, which was statistically higher than the mean of 4.40 shoots obtained in the treatment that only contained 6-BAP. The plant density of the nodal segments in both rootstock patterns only presented statistical differences in the variable number of leaves, exceeding the average density with 40 nodal segments to the density with 20 segments. In the rooting phase the Carrizo citrange rootstock, the best results with were obtained in the treatment that contained 2.00 mg L⁻¹ of IBA according to the variables plant length, number of leaves and percentage of plants with roots with respective means of 3.28. cm, 3.85 and 60%; while in the Swingle citrumelo rootstock, the best response was achieved with the treatment containing 2.00 mg L⁻¹ of NAA with a mean plant length of 3.21 cm, number of leaves 2.10 and 60% of plants with roots.

Keywords: nodal segments, temporary immersion system, growth regulators, direct organogenesis

I. INTRODUCCIÓN

“Los cítricos son uno de los cultivos más distribuidos en el mundo con un alto valor económico y medicinal. Dentro de los cítricos de valor comercial, la naranja dulce, agria y la mandarina contribuyen al 80 % de la producción mundial” ((FAO, 2011, como se citó en Hernández et al., 2013, par. 1). Esta especie es muy importante “por su alto contenido de agua, azúcares, ácidos, sales minerales, fibras y su alto contenido de vitamina C, son consideradas las frutas más frescas que forman parte de la vida diaria de millones de personas alrededor del mundo (Varela, 2018, párr. 1).

(Lacayo, 2013, como se citó en Martínez y Munguía, 2021) en Nicaragua la producción de cítricos genera 24.5 millones de dólares anuales y está a cargo de 11, 077 productores, en una superficie aproximada de 16, 500 hectáreas. Se cultiva por sus frutos y las propiedades que este posee, además de ser de agradable sabor, contiene gran valor nutricional. Los cítricos son utilizados para la elaboración de subproductos y se comercializan en forma de zumo fresco, mermeladas o jaleas, entre otros, según Paniagua (2015). Según el Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO, 2012) las mayores plantaciones de cítricos se encuentran en el departamento de Río San Juan (Municipio de San Carlos) con una superficie en manzanas sembradas de 3,287.42.

Existen muchos métodos de reproducción en cítricos, ya sea sexual o asexual. La reproducción asexual es el principal método utilizado y se subdivide en: reproducción por injerto, acodo, esqueje, estacas y en laboratorio (cultivos *in vitro*). “El cultivo *in vitro* significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. La forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento” (Sharry *et al.*, 2015, p. 8).

Lugo *et al.*, (2017) menciona que “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” (p. 1). Esto asegura el éxito de la micropropagación y la inmediata adaptación de las plantas a las nuevas condiciones ambientales. Además, se tiene la ventaja de que al iniciar con material sano esta condición se mantiene, garantizando que esté libre de patógenos al no estar expuestos a la intemperie.

Las técnicas de cultivo de tejidos emergen como una poderosa herramienta para incrementar la disponibilidad de patrones de cítricos (George, 1993). Los individuos obtenidos mediante esta técnica presentan la gran ventaja de mantener la uniformidad genética y preservar sus rasgos específicos, los cuáles influirán en el futuro crecimiento de la variedad injertada (Hartman y Kester, 1995). Las respuestas morfogénicas de los cítricos en la micropropagación están fuertemente influenciadas por el genotipo, edad y tipo de explante y composición del medio de cultivo (Carimi y De Pasquale, 2003; Pérez-Tornero *et al.*, 2009).

En general, la micropropagación se ha hecho a través de métodos convencionales de cultivo gelificado que utilizan a pequeña escala recipientes donde las concentraciones de sacarosa y la humedad relativa son extremadamente altas, y las concentraciones de CO₂ y los flujos de fotones fotosintéticos (PPF) son bajos. Como resultado, la micropropagación convencional es costosa y tiene una eficiencia de multiplicación relativamente baja (Bi *et al.*, 1997) citado por Hahn and Paek (2005).

La reproducción *in vitro* que hace uso del sistema de inmersión temporal es una herramienta clave para propagar plantas en ambientes esterilizados y herméticos. “se tienen grandes ventajas al disminuir la manipulación manual intensiva, incrementar la tasa de proliferación, reducir costos de producción y mejorar la calidad del material vegetal” (Lugo *et al.*, 2017, p. 270).

Generalmente los patrones de cítricos se propagan por semilla, sin embargo, la cantidad de semilla disponible es limitada para abastecer la demanda actual de árboles. En Nicaragua el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) a través del invernadero multiplicador del “Proyecto HLB” ha desarrollado una capacidad instalada de producción de más de 80,000 yemas y 25,000 plantas sanas de cítricos, libres de la enfermedad del Huanglongbing (HLB). (OIRSA, 2019).

Debido que todavía no se abastece la demanda nacional de árboles injertados de diferentes especies de cítricos, el empleo de la técnica de micropropagación haciendo uso del modelo de Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) es una alternativa para reproducirlos con fines comerciales y de investigación. En la presente investigación se evaluará el comportamiento de segmentos nodales de los patrones de cítricos *Citrango carrizo* y *Citrumelo swingle* en biorreactores BEIT en las fases de multiplicación y enraizamiento empleando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta morfológica de segmentos nodales de patrones de cítricos Citrange carrizo y Citrumelo swingle en la fase de multiplicación y en la fase de enraizamiento usando Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT).

2.2 Objetivos específicos

Seleccionar la mejor respuesta morfológica de segmentos nodales de patrones de cítricos Citrange carrizo y Citrumelo swingle por efecto solo o combinado de los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y Ácido Giberélico (GA₃) en la fase de multiplicación.

Evaluar en los patrones de cítricos Citrange carrizo y Citrumelo swingle la respuesta morfológica por efecto de la densidad de siembra con 20, 30 y 40 segmentos nodales

Determinar la mejor respuesta morfológica en el efecto individual de las auxinas Ácido indolbutírico (IBA) y Ácido Naftalenacético (ANA) con segmentos nodales de patrones de cítricos Citrange carrizo y Citrumelo swingle en la fase de enraizamiento.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Origen de las especies cítricas

Ibáñez, V. *et al.*, (2015) afirman que el “género *Citrus* está incluido en la subfamilia Aurantioideae, que pertenece a la familia Rutaceae. Esta familia, ampliamente distribuida por los trópicos, está formada por aproximadamente 160 géneros y 1.800 especies. Apareció hace aproximadamente 7 millones de años y muchos de los cultivares actuales proceden de cruces a partir de cuatro especies ancestrales de cítricos: *Citrus reticulata* (mandarinos), *Citrus máxima* (pomelos), *Citrus médica* (Cidros) y *Citrus micrantha* (papedas)”.

3.2 Descripción de patrones

Orduz, *et al.*, (2009), realizan una breve descripción de los patrones más utilizados, y son los siguientes:

Citrango 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.

Citrumelo swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Se conoce también como Citrumelo. Es un patrón trifoliado muy vigoroso. Su comportamiento en vigor varía con la especie injertada produciendo árboles pequeños con naranjo dulce y árboles grandes con toronja. Es tolerante a todas las virosis y a suelos ácidos, produce abundantes cosechas de buena calidad. Se adapta bien a suelos arenosos o limosos, pero no se comporta bien en suelos arcillosos con pH alto o con deficiente drenaje.

Además de estas características, tiene una tolerancia moderada a la sequía, pero es muy tolerante al frío. Citrumelo swingle es un portainjerto superior para toronjas, naranjas, mandarinas 'Nagpur' y clementinas (Ghosh, 2001).

3.3 Importancia del uso de patrones en cítricos

Orozco, (1996) reporta que el Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC) constituye hoy en día la enfermedad viral, de carácter letal, que más daño ha causado a la citricultura mundial. Desde fines de la década del 30 hasta los últimos años, esta enfermedad ha ocasionado la muerte de 50 millones de árboles en diversos países. Bar-Joseph *et al.*, (1989) reportan que es la enfermedad viral más importante de los cítricos en todo el mundo, responsable de la muerte de millones de naranjos, pomelos y mandarinos injertados sobre naranjo agrio (*Citrus x aurantium*, L.).

El VTC es una de las enfermedades transmisibles por injerto que ha tenido mayor importancia, tanto por los daños económicos que ha causado, como por los cambios que ha obligado a introducir en los sistemas de cultivo de las zonas afectadas. El VTC se encuentra presente con incidencia desigual en todas las zonas citrícolas del mundo. Es prácticamente endémico en todas las zonas de Asia, Australia, África del Sur y gran parte de Sudamérica, mientras que tiene una incidencia mínima en varios países del Mediterráneo (Cambra y Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2008) citados por Ruíz, S. (2009).

El VTC se transmite fácilmente por injerto al utilizar yemas infectadas y también es dispersado de manera semi-persistente por varias especies de pulgones, entre los que podemos citar a *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) y *Aphis gossypii* (Glover), que poseen la mayor eficiencia de transmisión (Cambra y Moreno, 2000).

Para disminuir el efecto de la enfermedad del virus de la tristeza desde hace años la mayoría de los países citricultores afectados por el VTC han ido sustituyendo el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), por patrones tolerantes al VTC como: Citrange "troyer" y "carrizo" (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* Raf.) (Padrón, 1991).

Ordúz *et al.*, (2009) afirman que para lograr una buena producción es importante utilizar patrones adecuados para utilizarlos como portainjertos:

Los patrones de cítricos influyen sobre más de 20 características hortícolas en la variedad injertada como son: el desarrollo y el vigor de la planta, la producción, la calidad interna de la fruta (grados brix, acidez, % de jugo), la presentación externa (forma, tamaño, color, textura y grosor de la cáscara, entre otras) y la resistencia o tolerancia a enfermedades y a condiciones de suelos y clima. Entre las ventajas se tiene la precocidad o rápida entrada a producción, uniformidad de la plantación, mayor producción por

planta, calidad de la fruta, adaptación a problemas fisicoquímicos del suelo (acidez, salinidad, asfixia radicular, sequía) y tolerancia a plagas y enfermedades (p. 5).

El patrón de cítricos Swingle' citrumelo es un híbrido de pomelo 'Duncan' y naranja trifoliada, es resistente a nemátodos y *Phytophthora*, puede sobrevivir en sitios con mal drenaje y produce un árbol vigoroso con excelentes rendimientos, con frutos de gran tamaño y alto contenido de jugo. (Dhatt y Singh, 1993). 'Swingle' es un portainjerto superior para toronjas, naranjas, mandarinas 'Nagpur' y clementinas (Ghosh, 2001).

3.4 Importancia del cultivo in vitro en cítricos

Martinez-Hernández *et al.*, (2006) afirman que “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, por ser un material vegetal rejuvenecido y libre de patógenos”.

Orellana (1998) afirma que la micropropagación vía organogénesis, al utilizar yemas axilares, ha demostrado en muchas especies, que es el método más confiable para lograr un proceso de proliferación repetible, sin alteraciones genéticas y libre de agentes contaminantes.

Las técnicas de cultivo de tejidos emergen como una poderosa herramienta para incrementar la disponibilidad de patrones de cítricos (George, 1993). Los individuos obtenidos mediante esta técnica presentan la gran ventaja de mantener la uniformidad genética y preservar sus rasgos específicos, los cuáles influirán en el futuro crecimiento de la variedad injertada (Hartman y Kester, 1995).

En la actualidad se pueden aplicar herramientas de biotecnología vegetal, como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, resultando en clones uniformes a partir de una planta madre libre de enfermedades y de gran producción, conservando y garantizando los rasgos seleccionados (Hasan *et al.*, 2019).

Varela, F. (2015) cita a varios investigadores que utilizaron diferentes tipos de tejidos vegetales para realizar la micropropagación en diferentes especies de cítricos:

Germaná *et al.*, (2011) reportan la formación de brotes adventicios a partir de segmentos de epicotilo provenientes de semillas de Citrange carrizo, obteniendo una baja

producción de yemas axilares con un 13 % en un lapso de 2 meses, los epicotilos sembrados en medio MS suplementado con Bencil Adenina (BA) en concentración de 1.00 mg L^{-1} produjeron un mayor número de brotes (1.40) en comparación con los suplementados con Tidiazuron (TDZ) en concentración de 0.10 mg L^{-1} con 0.80 brotes.

Hernández *et al.*, (2021) experimentando con brotes nodales de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) durante 30 días registraron resultados que indicaron la influencia de combinar dos citoquininas (BAP y kinetina) con AG_3 los tres adicionados al medio de cultivo a razón de 0.25 mg L^{-1} lo que permitió obtener el mayor número de brotes con promedio de 4.70.

3.5 Efecto de la composición del medio de cultivo

Hurtado y Merino (1994) proponen la fórmula Murashige y Skoog (1962) pues se ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta. Esta fórmula contiene grandes cantidades de nutrientes; también contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de NH_4 , NO_3 y KNO_3 .

Cada elemento del medio de cultivo influye de manera coordinada sobre el ciclo celular y por tanto son responsable de los fenómenos observados durante el cultivo *in vitro* (Martín *et al.*, 2015). En el cultivo de tejidos, los medios están compuestos por soluciones de los siguientes compuestos (George y Klerk, 2008):

- Macronutrientes: siempre empleados.
- Micronutrientes: casos siempre empleados, aunque ocasionalmente ha sido empleado un único componente, el hierro.
- Reguladores de crecimiento: casi siempre añadidos.
- Azúcares: añadido casi siempre, aunque omitido para algunos fines concretos.
- Vitaminas: incorporadas generalmente.
- Agente solidificante: cuando se requiere el empleo de medios semisólidos.
- Aminoácidos y otros compuestos nitrogenados.
- Suplementos no definidos como leche de coco.

El cultivo de tejidos de plantas requiere de una fuente continua de ciertos elementos químicos inorgánicos. A los elementos requeridos en mayores cantidades se les llama elementos macronutrientes. Además de los macronutrientes, las células de las plantas requieren pequeñas cantidades de ciertos elementos llamados micronutrientes (Dodds y Roberts, 1984).

Los nutrientes mayores o macronutrientes son: nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), y azufre (S). Los micronutrientes son el hierro (Fe), sodio (Na), cloro (Cl), manganeso (Mn), Zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y (posiblemente) níquel (Ni). George, (1993).

3.6 Reguladores de crecimiento

Del comportamiento de las auxinas, Machakova *et al.*, (2008) afirman:

A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos como la división y la elongación celular; su capacidad para iniciar la división celular las involucra en la formación de los meristemos, dando lugar a tejidos no organizados o a órganos definidos. En tejidos organizados y plantas completas, las auxinas estimulan la formación de haces vasculares, y participan en la diferenciación de yemas y raíces.

Bornman (1993), menciona que existen auxinas naturales y sintéticas, siendo las más comúnmente usadas el ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA)

En referencia al efecto de las citoquininas, Devlin, (1980) considera que:

“para que pueda tener lugar la división celular deben de sucederse una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis), en los cuales la presencia de las citoquininas es necesaria para la mitosis; además, si la citoquinina está presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante, por lo menos en uno de los tres pasos necesarios para la división. Hasta ahora se desconoce el mecanismo exacto de la inducción citoquinínica de la división celular”.

Entre los efectos de las citoquininas están la formación de órganos en los tejidos cultivados *in vitro*, a través de la inducción de yemas axilares o adventicias, la división y el alargamiento celular. La inducción de yemas *in vitro* se ha logrado con base en una proporción mayor de citocininas con respecto a auxinas, la llamada relación citocinina-auxina. En el cultivo estas

yemas no se inhiben de manera recíproca en su desarrollo, debido a que la dominancia apical puede ser limitada, las citocininas aplicadas en forma exógena en general activan el crecimiento de yemas laterales. (Cruz, 2012).

Las citoquininas son muy efectivas para promover la iniciación directa o indirecta de los brotes. Se ha descubierto que muchos aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis en cultivos de tejidos y órganos están controlados por una interacción entre las concentraciones de citoquinina y auxina (Woodward y Bartel, 2005).

Schinor *et al.*, (2011) citado por Hosein *et al.*, (2013) consideran que, aunque está bien informado que la organogénesis *in vitro* en *Citrus* se ve favorecida por medios de cultivo suplementados con citoquinina, el desarrollo de brotes adventicios puede ocurrir en medio basal, especialmente cuando se utilizan explantes muy jóvenes.

En meristemas y ápices, el nivel de citoquinina endógena es bajo debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de iniciación es necesaria, contrario a las auxinas que en zonas de crecimiento activo como ápices y meristemas son áreas de síntesis de auxinas, por lo que la concentración endógena es alta (Pérez *et al.*, 1998).

Algunos autores han afirmado:

Las auxinas y citoquininas son importantes en el crecimiento y morfogénesis en el cultivo de tejidos y órganos de plantas. Gracias a los efectos fisiológicos de los reguladores de crecimiento es posible inducir respuestas morfofisiológicas de interés durante el cultivo *in vitro*. Esto se debe a su influencia sobre el ciclo celular. El crecimiento de callos, suspensiones celulares, órganos entre otros (Machakova *et al.*, 2008, citado por Martín *et al.*, (2015).

Sugiyama (1999) citado por Hosein *et al.*, (2013) considera que la mayoría de las veces se requiere un equilibrio entre los reguladores del crecimiento de auxina y citoquinina para la formación de meristemas adventicios de brotes y raíces. Las interacciones entre las dos clases de reguladores suelen ser complejas y es probable que más de una combinación de sustancias produzca resultados óptimos.

Las citoquininas son muy efectivas para promover la iniciación directa o indirecta de los brotes. Se ha descubierto que muchos aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis en cultivos de tejidos y órganos están controlados por una interacción entre las concentraciones de citoquinina y auxina (Woodward y Bartel, 2005).

Cacho *et al.*, (1991) en *Digitalis thapsi*, añadieron las auxinas 2,4-D, AIA y ANA a diferentes concentraciones (0.10, 0.50, 1.00 y 2.00 mg) por separado; en los hipocotilos estas auxinas indujeron la formación de callos y raíces. Sin embargo, el empleo de 6-BAP indujo la formación de brotes. Este mismo autor describe que al combinar ANA y 6-BAP con kinetina resultó ser la auxina más efectiva para la regeneración de explantes foliares. Este constituye otro ejemplo donde se puede observar que la interacción entre el material vegetal inicial y las condiciones de cultivo definen las respuestas morfogénicas observadas.

Como parte del establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) Santiana (2014) cita autores que obtuvieron resultados similares a los anteriores al respecto:

El tratamiento suplementado con 0.25 mg L⁻¹ de 6-BAP obtuvo el 80% de los meristemas establecidos en el medio de cultivo, esto concuerda con estudios realizados por Al-Khayri y Al-Bahrany (2001) quienes realizaron experimentos en lima ácida con diferentes concentraciones de BAP obteniendo como resultado óptimo la concentración de hormona 0.25 a 0.50 mg L⁻¹, esta respuesta positiva se debe a que el 6-BAP estimula la división celular y la formación de brotes adventicios, pero inhibe la formación de raíces.

De acuerdo con el comportamiento de las giberelinas, tales son un grupo de reguladores del crecimiento, formadas de diterpenos, los cuales están compuestos por cuatro unidades de isopreno, por lo común formando tres anillos, además de presentar un puente de lactona (Vázquez y Torres, 1995).

Ciertos experimentos indican que la cantidad de GA₃ presente en la planta es mucho mayor en la proximidad del ápice del tallo, lo que señala que son suministradas principalmente por el ápice, más que por cualquier otra estructura como hojas jóvenes, embriones, etc. (George, 1993).

Las giberelinas son transportadas rápidamente dentro de la planta; este transporte parece no ser direccional, pues se mueve con la misma facilidad tanto acropétala como basipétalmente. Esta traslocación es llevada a cabo tanto en floema como xilema, puesto que se han encontrado

giberelinas trasladándose a una velocidad de 50 mm/h en la savia floemática y xilemática (Devlin, 1980).

3.7 Sistemas de inmersión temporal

La aplicación a escala comercial de la micropropagación tradicional se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes y altos costos ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las etapas de multiplicación y enraizamiento (Castro *et al.*, 2002).

El funcionamiento de los biorreactores se basa en la inmersión temporal de los tejidos en medios de cultivo líquidos. Uno de los modelos de biorreactores que más se utiliza actualmente en la propagación *in vitro* de plantas a nivel mundial, es el desarrollado por Teisson y Alvard (1994) que denominaron Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®).

El uso de biorreactores para la propagación de plantas fue por primera vez reportado por Takayama y Misawa en 1981 para la propagación de Begonia. A partir de este momento, esta técnica ha sido aplicada para muchas especies de plantas incluyendo brotes, bulbos, microtubérculos, cormos, etc., (Preil, 1991; (Debergh y Zimmerman, 1991).

Los biorreactores brindan la posibilidad de automatizar el proceso de propagación *in vitro* de la gran mayoría de las especies. Además, solucionan las dificultades de los medios de cultivo líquidos estáticos (en frascos con agar) al facilitar la manipulación del ambiente *in vitro*, lo que permite controlar parámetros de cultivos y favorece el crecimiento e incrementa la eficiencia biológica del material vegetal (Escalona *et al.*, 2006, citados por Navarro, 2019).

3.8 Efecto de la densidad de inoculación de tejidos en BEIT

Bello *et al.*, (2021) consideran que la densidad de explantes por biorreactor es un factor que permite controlar aspectos fisiológicos durante el desarrollo *in vitro* de explantes. Los explantes compiten por los nutrientes del medio de cultivo, la luz y el espacio, resultando que una alta densidad de siembra de explantes por biorreactor puede ser perjudicial para su desarrollo, mientras que a una baja densidad de siembra los explantes pueden no aprovechar los componentes del medio, desperdiciando recursos.

Hay factores variados como la densidad del inóculo, el volumen de aireación y la intensidad de la luz que afectan la regeneración de los brotes que deben analizarse minuciosamente en ciertos sistemas de biorreactores. La densidad del inóculo es un parámetro físico importante que influye en el crecimiento durante la micropropagación. Una densidad de inoculación óptima es necesaria para el crecimiento dinámico y la proliferación de cultivos *in vitro*. Murthy *et al.*, (2023) citando a Jin *et al.*, (2013).

De acuerdo con Pérez *et al.*, (2007) el uso de pequeñas densidades de inóculo podría causar la subutilización de los recipientes de cultivo y la capacidad de los cuartos de cultivo. Por otro lado, las altas densidades pueden causar malformaciones fenotípicas y disminución de la calidad de las plantas o microtubérculos de papa. Por lo tanto, es muy importante evaluar este factor experimentalmente para aprovechar al máximo la capacidad de los biorreactores sin afectar la calidad de los microtubérculos.

Aguilar, (2014) reportado por Navarro (2019) señala que el empleo de los Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) desarrollado en la Universidad Nacional Agraria (UNA) en el laboratorio de cultivo de tejidos para la producción masiva de plantas *in vitro* tiene las ventajas de evitar la inmersión continua del material vegetal en el medio del cultivo, proveen adecuada transferencia de oxígeno, bajos costos de adquisición, se pueden armar fácilmente, se reduce el tiempo y su costo de producción, favoreciendo la mejora de la calidad genética y fitosanitaria de cultivos como plátano, caña de azúcar, teca, etc.

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 (UNA), ubicado en el Km. 12 ½ carretera norte en el departamento de Managua, Nicaragua.

4.2 Selección de material genético

El inicio del cultivo *in vitro* se realizó a partir de renuevos o varetas en crecimiento activo de aproximadamente 16 cm conteniendo su yema apical con 3 o 4 yemas axilares extraídas de plántones certificados suministrados por el banco de germoplasma del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), que se encuentra ubicado en la finca experimental “El Plantel” propiedad de la Universidad Nacional Agraria (UNA), localizada en el kilómetro 42.5 carretera Tipitapa-Masaya, en el municipio de Nindirí. En la Figura 1 observa la estructura túnel cubierto con tela anti-áfida que contiene el banco de germoplasma de cítricos con plantas madres.



Figura 1. Banco de germoplasma del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) en finca “El Plantel”, (UNA).

Los patrones de cítricos Citrange carrizo y Citrumelo swingle fueron seleccionados para el estudio de micropropagación en las fases de multiplicación y de enraizamiento en condiciones del modelo de biorreactor BEIT. Las plantas madre de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle se presentan en la Figura 2.



Figura 2. Plantas madres. Izquierda: Citrange carrizo. Derecha: Citrumelo swingle.

Posteriormente se trasladó el material genético a las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la UNA, dónde se procedió a aplicarles un lavado con agua del grifo y detergente durante 20 minutos para eliminar los residuos de polvo y suciedad.

4.3 Diseño de la investigación, diseño experimental y diseño de tratamientos

4.3.1 Fase de multiplicación

a. Experimento 1. Multiplicación de segmentos nodales

En esta fase se tomaron segmentos nodales individuales de plantas *in vitro* con longitud aproximada de 1 cm que se formaron a partir de yemas axilares contenidas en los segmentos nodales de las varetas que se establecieron y permanecieron en el medio de cultivo durante cuatro semanas. En la figura 4 se observan plantas *in vitro* de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle con respectivos segmentos nodales.



Figura 4. Crecimiento in vitro de patrones de Citrange Carrizo y Citrumelo Swingle a partir de yemas axilares. a y b) planta y segmento nodal de Citrange carrizo. c y d) planta y segmento nodal de Citrumelo swingle

En el experimento de multiplicación se evaluó la respuesta morfológica de los segmentos nodales individuales en el modelo de biorreactor BEIT, para ello los tejidos se establecieron en 5 tratamientos que consistieron en variantes de medios de cultivo, sembrándose en cada BEIT 20 segmentos nodales individuales obteniendo un total de 100 segmentos. A cada biorreactor BEIT se le agregó un volumen de 200 ml de medio por tratamiento, los que a su vez contenían las sales MS (1962) los reguladores de crecimiento 6-BAP y GA₃ agregados solos o combinados como se describe en el Cuadro 1. A las sales MS además se adicionaron 100 mg L⁻¹ de inositol, 3.00 g L⁻¹ de agar y 30 g L⁻¹ de sacarosa. En todos los tratamientos se ajustó el pH del medio a 5.7 ± 0.1 con las soluciones de NaOH 0.1 N (Hidróxido de sodio) o HCl (Ácido clorhídrico).

Cuadro 1. Variantes de medios de cultivo que se utilizaron en la fase de multiplicación de segmentos nodales de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle en biorreactores BEIT

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	6-BAP*	GA ₃ **
T ₀	2.00	0.00
T ₁	2.00	0.50
T ₂	2.00	1.00
T ₃	2.00	1.50
T ₄	2.00	2.00

*6-Bencil amino purina, **Ácido giberélico

En cada patrón los tratamientos se ordenaron en un Diseño Completo al Azar (DCA) con arreglo unifactorial conformado por 5 tratamientos y 20 observaciones por cada tratamiento para un total de 100 segmentos nodales individuales.

b. Experimento 2. Efecto de la densidad de siembra

En el experimento de densidades de siembra en los BEIT se empleó el medio de cultivo que contenía 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0.50 de GA₃, en el que se obtuvo buena respuesta de los segmentos nodales en la brotación axilar en fase de multiplicación.

Las variables evaluadas, el diseño del experimento, el análisis estadístico y el procesamiento de datos se realizó de forma similar a los descritos en el experimento de la fase de multiplicación.

4.3.2 Fase de enraizamiento

a. Experimento 3. Efecto de las auxinas en la rizogénesis

En la fase de enraizamiento se estudió la respuesta en el desarrollo de raíces en segmentos nodales individuales de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle. Se realizó la siembra en el medio que contenía las sales MS (1962) suplementado con tres dosis de IBA y ANA más el tratamiento testigo que contenía solamente las sales MS (1962) sin la adición de hormonas de crecimiento (Ver cuadro 2). Cada tratamiento lo conformaron 20 segmentos nodales individuales con ±1 cm de longitud y la evaluación se realizó a las 4 semanas de permanecer en el biorreactor BEIT.

Cuadro 2. Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento de brotes en los segmentos nodales de patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	IBA*	ANA**
T ₀	0.00	0.00
T ₁	1.00	0.00
T ₂	1.50	0.00
T ₃	2.00	0.00
T ₄	0.00	1.00
T ₅	0.00	1.50
T ₆	0.00	2.00

*Ácido indolbutírico, **Ácido indol acético

Para el experimento de enraizamiento *in vitro* de los dos patrones de cítricos se empleó de forma individual un DCA unifactorial conformado por 7 tratamientos y 20 observaciones (segmentos nodales) por tratamiento para un total de 140 observaciones.

4.4 Manejo del ensayo y metodología

4.4.1 Ensamblaje del sistema de inmersión BEIT

En el modelo de biorreactor BEIT la inmersión de los tejidos se realiza en un recipiente de vidrio con capacidad de un litro. Sobre la tapa plástica de los BEIT se colocan fijamente dos filtros constituidos de acetato de celulosa para evitar la contaminación de microorganismos dentro de ellos.

El período de inmersión se produce por la entrada al BEIT del flujo de aire a una presión de 0.2 bar suficiente para impulsar el medio líquido que se agregó en cantidad de 200 ml por BEIT. Durante el ingreso de aire en cada biorreactor se produce un burbujeo en el medio de cultivo que permite la oxigenación de los tejidos que previamente se colocaron sobre un soporte de poliuretano y una vez finalizada la inmersión el medio líquido se asienta quedando los tejidos cubiertos únicamente por una capa de medio de cultivo. La inmersión se realizó una vez por día con un tiempo de inmersión de tres minutos.

4.4.2 Establecimiento del estudio

El proceso de desinfección se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia; los tejidos se sumergieron dentro de un beacker de 2000 ml en fungicida benomil

durante 10 minutos, se procedió a hacer un enjuague con agua esterilizada y nuevamente se vuelven a sumergir en cloro comercial al 1% durante 10 minutos y se finalizó haciendo el enjuague con agua esterilizada para eliminar residuos de benomil y/o cloro.

Finalizado el proceso de desinfección de los explantes, se procedió al establecimiento colocando las varetas sobre platos de acero inoxidable donde se realizaron los cortes con ayuda de hojas de bisturí esterilizadas para garantizar que el proceso de extracción de los segmentos nodales individuales se realizara de forma rápida para no lastimar la yema axilar de cada explante. En la Figura 3 se observan varetas a las que se le extrajeron segmentos nodales individuales y la brotación de la yema axilar de un segmento nodal.



Figura 3. Izquierda: varetas extraídas de las plantas madres de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle. Derecha: brotación de yema axilar de segmento nodal a las 4 semanas del establecimiento.

En cada frasco de vidrio con volumen de 200 ml se agregaron 10 ml de medio de cultivo de consistencia semisólida constituido por las sales MS (1962) y enriquecido con 2 mg L⁻¹ de 6-BAP. En cada frasco se sembraron 5 segmentos individuales y permanecieron en la fase de establecimiento durante 4 semanas.

4.5 Datos evaluados

4.5.1 Experimento 1. Multiplicación de segmentos nodales

La respuesta a los tratamientos de los segmentos nodales se realizó a las 4 semanas de establecido el experimento, evaluándose las siguientes variables en los dos patrones de cítricos:

- Longitud del brote principal: se midió en cm en el brote que tenía el mayor crecimiento (brote principal)
- Número de brotes axilares por cada segmento nodal.
- Número de hojas del brote principal.

4.5.2 Experimento 2. Efecto de la densidad de siembra

- Densidad de siembra: Se evaluaron densidades de 20, 30 y 40 segmentos nodales en biorreactores BEIT.

4.5.3 Experimento 3. Efecto de las auxinas en la rizogénesis

- Longitud de planta
- Número de brotes
- Número de hojas
- Porcentaje de plantas con raíz

4.6 Análisis de los datos

En cada uno de los experimentos se registraron los datos paramétricos de cada variable evaluada; posteriormente se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, para comprobar si los datos siguen una distribución normal. A los datos que tienen una distribución normal, se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller = 0.05. En la fase de enraizamiento los datos de porcentaje de plantas con raíces se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y para conocer las diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Para el procesamiento de datos se empleó el paquete estadístico INFOSTAT 2020, versión libre (InfoStat/L).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Experimento 1. Multiplicación de segmentos nodales

5.1.1 Patrón Citrange carrizo

La variable longitud de brote principal presentó respuesta estadística similar en todos los tratamientos. En el tratamiento T₀ (testigo) la media fue de 0.67 cm siendo significativamente inferior a la media lograda en el tratamiento T₄ desde el punto de vista estadístico.

En número de brotes producidos en los tratamientos T₁ y T₂ con medias respectivas de 5.18 y 4.39 fueron similares entre ellos y al resto de tratamientos. Los tratamientos T₃ y T₄ con medias de número de brotes de 3.86 y 3.65 respectivamente resultaron ser estadísticamente similares al tratamiento T₂ el tratamiento T₀ fue el que obtuvo menor número de brotes. Por otro lado, el mayor número de hojas producidas por el brote principal se obtuvo T₃ y T₄. Los tratamientos T₀ y T₁ obtuvieron las menores medias para esta variable.

En el Cuadro 3 se presenta la respuesta estadística de los segmentos nodales del patrón Citrange carrizo en base a la evaluación de las variables longitud del brote principal, número de brotes y número de hojas del brote principal. En la Figura 5 se observan las plantas formadas en la fase de multiplicación en biorreactores BEIT de un litro a las cuatro semanas.

Cuadro 3. Variables de longitud del brote principal, número de brotes y número de hojas del brote principal del segmento nodal del patrón Citrange carrizo después de cuatro semanas en la fase de multiplicación

Tratamientos	Hormonas de crecimiento		Variables		
	6-BAP* (mg L ⁻¹)	GA ₃ ** (mg L ⁻¹)	Longitud del brote principal (cm)	Número de brotes por segmento nodal	Numero de hojas del brote principal
T ₀	2.00	0.00	0.67 b	2.80 c	1.55 c
T ₁	2.00	0.50	0.95 ab	5.18 a	1.74 c
T ₂	2.00	1.00	1.00 ab	4.39 ab	2.13 bc
T ₃	2.00	1.50	1.04 ab	3.86 bc	2.45 ab
T ₄	2.00	2.00	1.27 a	3.65 bc	2.78 a
CV			2.43	22.56	6.32

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



Figura 5. Izquierda: Brotes axilares del patrón Citrange carrizo en la fase de multiplicación a las dos semanas de crecimiento en biorreactor BEIT. Derecha: Brotación a las cuatro semanas de crecimiento.

5.1.2 Patrón Citrumelo swingle

La variable longitud del brote principal presentó respuesta estadística similar en los tratamientos T_0 , T_1 , T_2 y T_3 con medias respectivas de 0.76, 1.01, 1.15 y 1.07 cm, únicamente por efecto del tratamiento T_0 con media de 0.76 cm resultó significativamente inferior a la media 1.48 cm que se obtuvo por el tratamiento T_4 .

En número de brotes producidos en los tratamientos T_0 , T_2 , T_3 y T_4 tuvieron respuesta estadística similar correspondiéndoles medias de brotes de 4.40, 5.20, 4.90 y 5.15. El tratamiento T_1 con media de número de brotes de 6.00 resultó superior al resto de tratamientos y estadísticamente diferente al testigo T_0 .

Para la variable número de hojas del brote principal el tratamiento T_0 presentó la mejor respuesta y fue similar estadísticamente al efecto del tratamiento T_1 y diferente al resto de los tratamientos.

Los resultados del comportamiento estadístico en las variables longitud de brote principal, número de brotes y número de hojas del brote principal obtenidas en segmentos nodales del patrón Citrumelo swingle se presentan en el Cuadro 4. En la Figura 6 se observan plantas formadas en la fase de multiplicación en biorreactor BEIT a las cuatro semanas.

Cuadro 4. Variables de longitud del brote principal, número de brotes y número de hojas del brote principal del patrón Citrumelo swingle a las cuatro semanas de evaluadas

Tratamientos	Hormonas de crecimiento		Variables		
	6-BAP* (mg L ⁻¹)	GA ₃ ** (mg L ⁻¹)	Longitud del brote principal (cm)	Número de brotes por segmento nodal	Número de hojas del brote principal
T ₀	2.00	0.00	0.76 b	4.40 b	2.90 a
T ₁	2.00	0.50	1.01ab	6.00 a	2.45 ab
T ₂	2.00	1.00	1.15 ab	5.20 ab	2.05 b
T ₃	2.00	1.50	1.07 ab	4.90 ab	1.95 b
T ₄	2.00	2.00	1.48 a	5.15 ab	1.85 b
CV			3.03	13.54	5.25

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

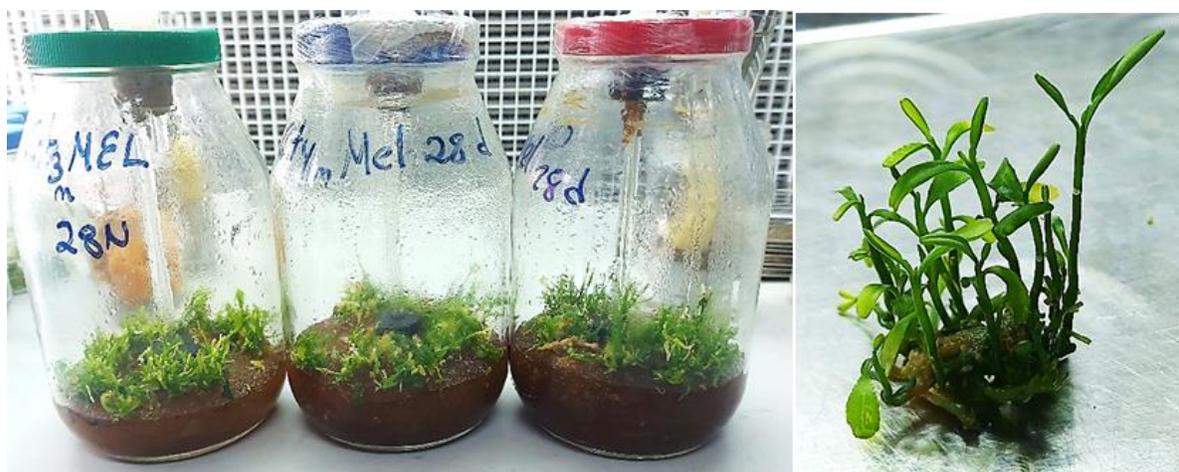


Figura 6. Izquierda: Brotes axilares del patrón Citrumelo swingle en la fase de multiplicación a las dos semanas de crecimiento en biorreactor BEIT. Derecha: Brotación axilar a las cuatro semanas de crecimiento.

Hurtado y Merino, (1994) mencionan que el GA₃ es importante en el cultivo de tejidos vegetales debido a que presenta un espectro de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, ya que este puede producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos.

En Citrange carrizo y Citrumelo swingle de acuerdo con el comportamiento estadístico de la variable brotación axilar en los tratamientos que se les adicionaron combinaciones de 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0.50 mg L⁻¹ de GA₃, se logró una mejor respuesta estadística en comparación al tratamiento sin reguladores de crecimiento

En Citrange carrizo por ejemplo en el número de brotes en el tratamiento T₀ que solo contenía 2 mg L⁻¹ de 6-BAP se obtuvo respuesta estadística inferior a las medias obtenidas en los tratamientos que se contenían 2 mg L⁻¹ de 6-BAP combinado con 0.50 o 1.00 mg L⁻¹ de GA₃.

Autores como Pérez-Luna *et al.*, (2013) reportados por Méndez *et al.*, (2020) reportaron los resultados obtenidos usando segmentos nodales e internodales para la inducción de brotes adventicios de limón persa, logrando producir hasta 4 brotes por explante en un medio de cultivo de consistencia sólida y conteniendo 1 mg L⁻¹ de 6-BAP. El inconveniente que observaron fue que los brotes presentaron defoliación en un 22% y el 28% presentaron formación de callos.

Los resultados obtenidos del presente estudio no muestran la formación de brotes adventicios regenerados vía organogénesis indirecta, debido posiblemente a que se experimentó con dosis bajas de reguladores de crecimiento y los segmentos nodales son tejidos que garantizan una buena estabilidad genética, lo que favorece a que los eventos de variación genética sean mínimos, contrario a lo que suele ocurrir con la aplicación de concentraciones más altas en la propagación clonal, ya que pueden inducir varias aberraciones genéticas que dan como resultado la formación de plantas deformes o fuera de tipo.

Kanwar *et al.*, (2013) destacan que en Citrange carrizo la presencia de BAP y GA₃ en el medio de multiplicación resultó fundamental para la multiplicación de los explantes, pero el BAP tuvo mayor influencia en la multiplicación de brotes y el GA₃ en elongación de brotes. Con el empleo del medio de cultivo que contenía las sales MS y concentraciones de 1.00 mg L⁻¹ tanto de BAP como de GA₃ se obtuvo una media de 7.90 brotes y una longitud de los brotes de 3.00 cm. Estos mismos autores observaron que con el incremento de las dosis de BAP y GA₃ a 2.00 mg L⁻¹ se inhibió el número de brotes. Esto puede deberse a que la citoquinina a alta concentración afectó significativamente formación de brotes laterales.

En los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle la adición de BAP en combinación con GA₃ ejercieron un efecto sinérgico por lo que resultaron necesarios adicionarlos en la fase de

multiplicación. Lukman *et al.*, (1990) citados por Rojas (2001) obtuvieron buenos resultados en el cultivo de meristemas de Citrange troyer empleando las sales MS de consistencia líquida suplementado con 1.00 mg L⁻¹ de AG₃ y 0.80 mg L⁻¹ de BA. Carimi y De Pasquale (2003), afirman que las giberelinas son frecuentemente empleadas para promover la elongación de los tallos en los cítricos.

Kaur (2016) en la fase de multiplicación *in vitro* de *Citrus jambhiri Lush* considera que posiblemente una concentración 0.50 mg L⁻¹ de BA sigue estimulando la iniciación de los brotes, al tiempo que reduce la dominancia de los brotes recién formados, mientras que GA₃ promueve el alargamiento de los brotes iniciados en el medio de inducción.

El promedio de brotes reportado por Méndez *et al.*, (2020) resultó similar al obtenido en este estudio con los dos patrones que experimentamos utilizando biorreactores BEIT como se observa en los cuadros 1 y 2. No se alcanzaron los promedios reportados por Hernández *et al.*, (2013) con limón criollo (*Citrus aurantifolia* Christm Swing) var. Mexicana en la fase de multiplicación quienes con el uso combinado de 1.00 mg L⁻¹ AG₃ y 2.00 mg L⁻¹ de 6-BAP obtuvieron 8.61 brotes por explante.

Además del efecto sinérgico del 6-BAP y del GA₃ no se debe minimizar el efecto de las condiciones dentro de los biorreactores BEIT que pudieron favorecer para que la defoliación de los brotes haya sido mínima como también lo reportan Herrera-Flores *et al.*, (2017) en la micropropagación de limón persa (*Citrus × latifolia* Tan.) quienes para disminuir la defoliación emplearon un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) del tipo de frascos gemelos modificado; bajo este esquema, se logró obtener un promedio de 1.20 brotes por explante de mejor calidad.

En la variable número de hojas del brote principal la respuesta por efecto de los tratamientos fue diferente entre Citrange carrizo y Citrumelo swingle, mientras que en Citrange carrizo se favoreció a mayores concentraciones de 6-BAP y GA₃, en Citrumelo swingle esta variable respondió mejor a la no adición de GA₃. Este comportamiento puede deberse a la respuesta genotípica como lo reportan Litz y Jarret (1991) quienes argumentan que la variación en la respuesta de ciertos explantes pertenecientes a la misma especie vegetal puede ser considerable, más aún, puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante.

Jiménez, (1998) considera que uno de los factores de mayor importancia es el genotipo del material a propagar, ya que la respuesta *in vitro* suele ser diferente para cada una de las especies e incluso para las distintas variedades o clones dentro de la misma especie. Al ser diferente la respuesta para cada genotipo, sus requerimientos hormonales, nutricionales y las condiciones de cultivo (temperatura, luz, etc.) van a variar, por tanto, es necesario establecer las condiciones específicas para cada uno de ellos, así como la forma de su manejo *in vitro* con vistas a lograr tasas de multiplicación razonables.

De acuerdo con Tallón *et al.*, (2015) las respuestas morfológicas de los cítricos *in vitro* están fuertemente influenciadas por el genotipo, edad y tipo de explante y composición del medio de cultivo. Bordón *et al.*, (2000) afirman que el genotipo afecta la respuesta morfológica de segmentos de epicotilo cultivados *in vitro* de portainjertos de cítricos. Las diferencias cualitativas y cuantitativas en la respuesta organogénica indica que las condiciones para la regeneración deben optimizarse para cada genotipo.

5.2 Experimento 2. Efecto de la densidad de siembra

5.2.1 Patrón Citrange carrizo

En el patrón Citrange carrizo no se registraron diferencias significativas entre las medias de las variables longitud del brote principal y número de brotes axilares cuando se emplearon densidades de siembra de 20, 30 y 40 segmentos nodales por BEIT. En las Figuras 7 y 8 se presentan los resultados logrados a las cuatro semanas de iniciado el experimento.

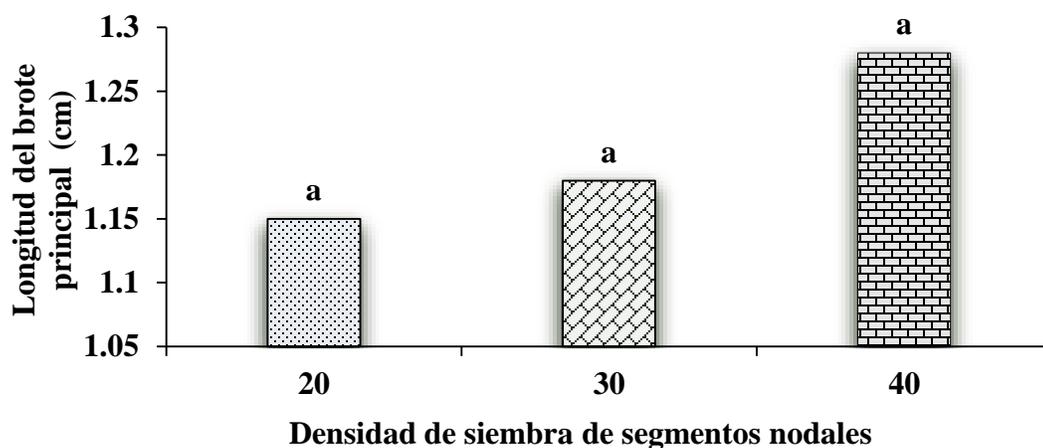


Figura 7. Variable longitud del brote principal del patrón Citrange carrizo evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales con 3 densidades de siembra.

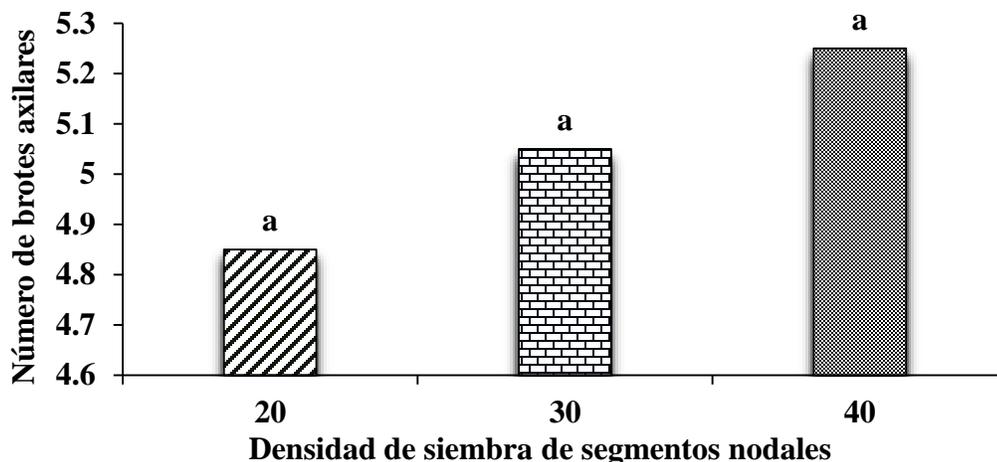


Figura 8. Variable número de brotes del patrón Citrange carrizo evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales con 3 densidades de siembra.

Entre las medias de la variable número de hojas se presentaron diferencias estadísticas entre las plantas que se sembraron en la densidad de siembra de 40 segmentos nodales con media de 2.80 y la densidad de siembra de 20 segmentos nodales con media de 2.40 hojas. En la Figura 9 se presentan los resultados logrados a las cuatro semanas de realizado el experimento y en la Figura 10 se observan plantas *in vitro* en BEIT con densidades de siembra de 20, 30 y 40 segmentos nodales.

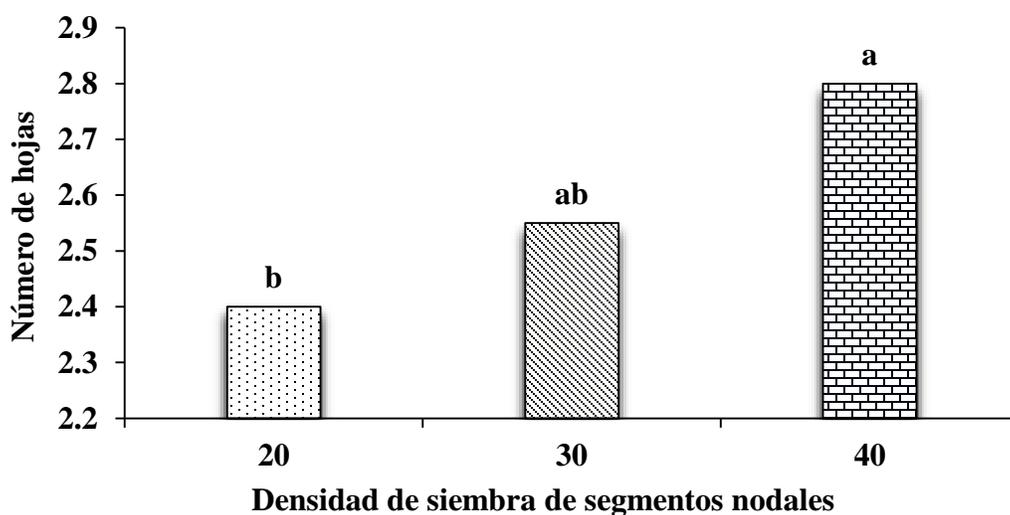


Figura 9. Variable número de hojas del patrón Citrange carrizo evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.



Figura 10. Brotación axilar del patrón de Citrange carrizo en la fase de multiplicación con densidades de siembra de: a) 20 segmentos nodales. b) 30 segmentos nodales c) 40 segmentos nodales a las cuatro semanas de crecimiento en BEIT de 1 litro.

5.2.2 Patrón Citrumelo swingle

Por efecto de la densidad de siembra de los segmentos nodales no presentaron diferencias estadísticas entre las medias obtenidas en las variables longitud del brote principal y número de brotes axilares. Los resultados se presentan en las Figuras 11 y 12.

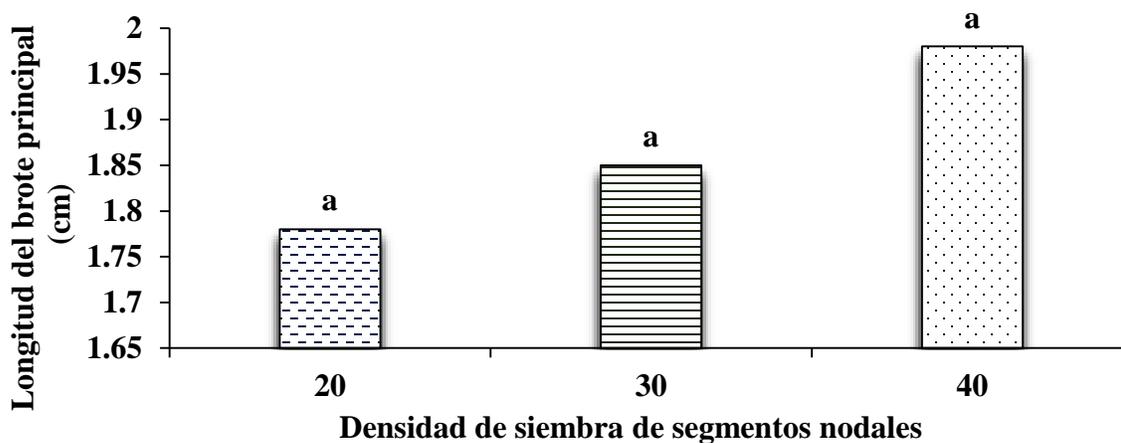


Figura 11. Variable longitud del brote principal del patrón Citrumelo swingle evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.

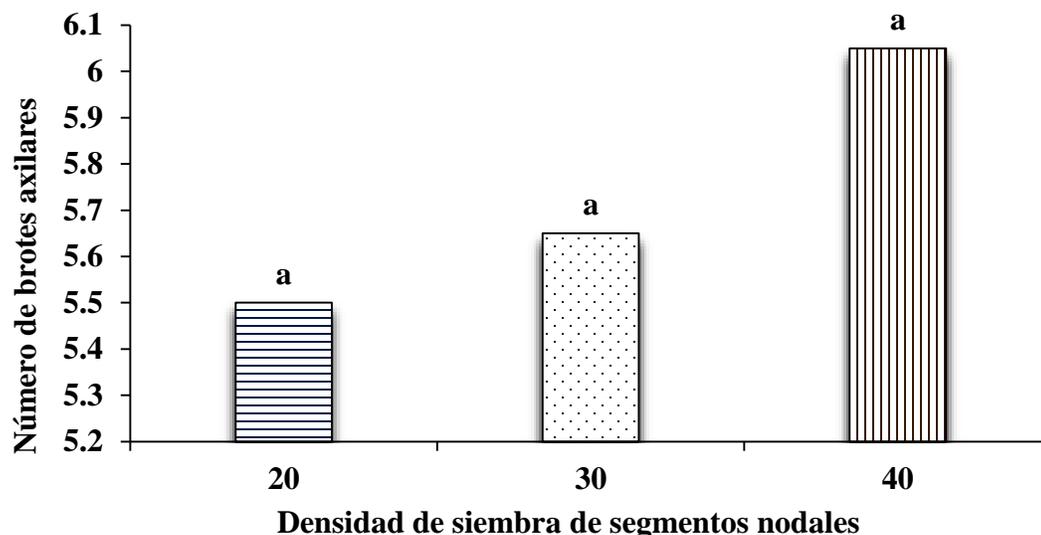


Figura 12. Variable número de brotes axilares del patrón Citrumelo swingle evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.

La densidad de siembra de los tejidos influyó en el comportamiento estadístico de la variable número de hojas, resultando significativamente superior con media de 2.95 cuando se empleó una densidad de siembra de 40 segmentos nodales en relación con la densidad de 20 segmentos que alcanzó una media de 2.55 hojas. En la Figura 13 se presentan los resultados a las cuatro semanas de realizado el experimento y en la Figura 14 se observan plantas *in vitro* de Citrumelo swingle en BEIT con densidades de siembra de segmentos nodales de 20, 30 y 40.

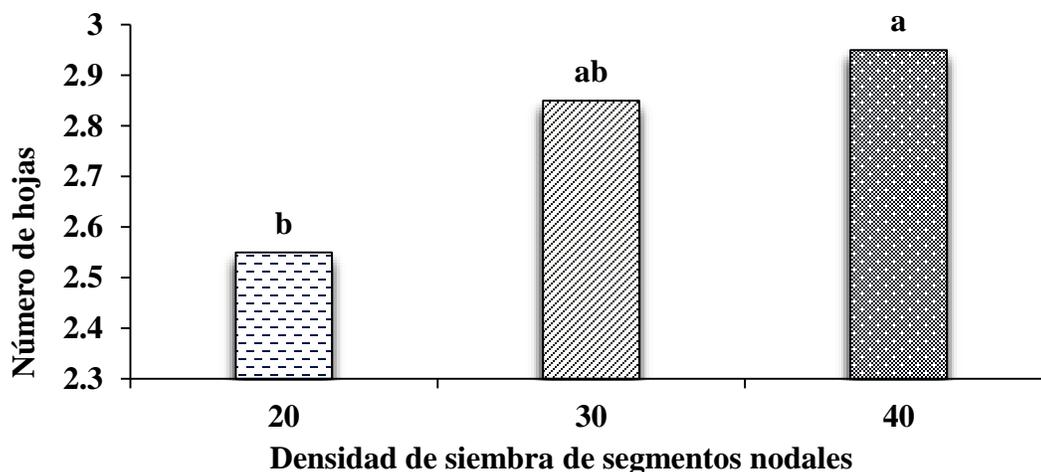


Figura 13. Variable número de hojas del patrón Citrumelo swingle evaluadas a las cuatro semanas de la siembra de los segmentos nodales.



Figura 14. Brotación axilar del patrón Citrumelo swingle en la fase de multiplicación con densidades de siembra de: a) 20 segmentos nodales. b) 30 segmentos nodales c) 40 segmentos nodales a las cuatro semanas de crecimiento en BEIT.

Según Piqueras y Debergh (1999), la densidad de inóculo como variable tiene su fundamento en la cantidad de volumen de medio de cultivo disponible por explante, además del espacio físico para su desarrollo. Es posible que el poco desarrollo morfo-fisiológico y la afectación en los explantes sea debido a un insuficiente inóculo, influenciado a su vez por la disponibilidad del medio de cultivo y el ambiente *in vitro*. Estos factores, influyen directamente en el desarrollo de los brotes y los procesos morfogénicos.

Aunque en los experimentos con los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle no se evaluó la producción de biomasa de las plantas que se formaron a las cuatro semanas en las tres densidades de siembra, consideramos que las diferencias estadísticas que se presentaron en la variable número de hojas entre las plantas formadas en las densidades de 20 y 40 tejidos, puede ser un indicativo de que en el modelo de biorreactor BEIT de un litro con la inoculación de 40 segmentos nodales el número de hojas fue superior debido posiblemente a que los tejidos hacen un uso eficiente de los componentes del medio de cultivo y que la atmósfera dentro del recipiente también es óptima.

Polzin *et al.*, (2014) experimentando con *Dioscorea cayenensis-rotundata* con densidades de inoculación de 5, 10, 15 y 20 segmentos nodales por biorreactor RITA® no registraron un efecto significativo en el número de yemas producidas después de 2 meses de cultivo con resultados que varían entre 2.50 y 3.10 yemas por segmento nodal (correspondientes a 15 y 20 segmentos de vástago por biorreactor respectivamente).

Vanegas y Araúz (2023) en piña cv. MD-2 (*Ananas comosus* L. Merrill) estudiaron densidades de siembra de 70, 80, 90 y 100 tejidos en el modelo de biorreactor de movimiento ondulatorio (BIMOT) con capacidad de siete litros y funciona con un recipiente que contiene los tejidos y el medio de cultivo líquido. En la variable número de brotes axilares no se encontraron diferencias estadísticas entre las medias de las cuatro densidades de siembra; pero obtuvieron los mejores resultados en longitud de tallo con densidad de siembra de 100 tallos con media de 2.55 cm que resultó superior estadísticamente a las medias de 1.90 y 2.03 cm que se registraron en las densidades de 70 y 80 respectivamente. En número de raíces la densidad de siembra de 70 con media de 1.15 únicamente resultó superior estadísticamente a la media de 0.65 alcanzada con densidad de siembra de 100 tejidos. Esto ha sido de importancia para la confirmación de las variables a medir y la metodología empleada

Pérez *et al.*, (2007) en etapa de tuberización del cultivo de papa inocularon 60 y 90 segmentos nodales individuales por Recipiente de Inmersión Temporal (TIS), observando que en el tratamiento con 90 explantes por TIS los brotes mostraron excesivo agrandamiento y estrangulamiento en el área apical; se formaron callos de consistencia acuosa en la superficie de brotes. Los síntomas descritos son probablemente debido a la baja disponibilidad de oxígeno dentro del recipiente de cultivo debido a la gran cantidad de producción de biomasa. Además, el número medio de microtubérculos obtenido por TIS fue de 168 en el tratamiento con 60 explantes, y significativamente mayor con 234 en el tratamiento con 90 explantes. Sin embargo, el peso fresco total de microtubérculos por TIS fue de 164.7g en el tratamiento con 60 explantes mientras que con 90 explantes solo se alcanzaron 47 g de peso fresco.

De acuerdo con los resultados obtenidos por diferentes autores en la micropropagación de muchos cultivos, para lograr resultados más fiables en dependencia del cultivo y del modelo de biorreactor que se emplee en la micropropagación vía organogénesis, es necesario analizar el efecto de factores entre los que se encuentran la cantidad de medio de cultivo por explante, la concentración de las sales del medio de cultivo, la frecuencia y el tiempo de inmersión.

5.3 Experimento 3. Efecto de las auxinas en la rizogénesis

5.3.1 Patrón Citrange carrizo

En los siete tratamientos la longitud de planta registró medias entre 2.45 y 3.85 cm, presentándose en el tratamiento T₄ la mayor media de longitud de planta que solamente resultó estadísticamente superior al tratamiento T₀ que no se le adicionaron reguladores de crecimiento y al T₅ que contenía 1.50 mg L⁻¹ de ANA con medias respectivas de 2.45 y 2.65 cm. Se presentó respuesta estadística similar entre las medias obtenidas en el tratamiento T₀ y los tratamientos que se les adicionaron diferentes concentraciones de IBA.

En la variable número de brotes no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias obtenidas en los tratamientos que se adicionaron tres concentraciones de IBA y tres concentraciones de ANA. Sin embargo, se obtuvieron los mayores números de brotes en el T₀, T₁ y T₄.

En el tratamiento T₀ la media de número de hojas de 2.40 resultó significativamente inferior únicamente a las medias obtenidas en los tratamientos T₃ que se le adicionaron 2.00 mg L⁻¹ de IBA y el tratamiento T₄ con adición de 1.00 mg L⁻¹ de ANA presentando medias respectivas de 3.85 y 4.20 hojas. Los resultados de las variables longitud de planta, número de brotes y número de hojas se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Efecto del IBA y de ANA en variables de longitud de planta, número de brotes y número de hojas segmentos nodales del patrón Citrange carrizo en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de evaluadas

Tratamientos	IBA* (mg L ⁻¹)	ANA** (mg L ⁻¹)	Variables		
			Longitud de planta	Número de brotes	Número de hojas
T ₀	0.00	0.00	2.45 b	0.50 a	2.40 c
T ₁	1.00	-	2.73 ab	0.35 ab	3.40 abc
T ₂	1.50	-	2.83 ab	0.25 b	3.45 abc
T ₃	2.00	-	3.28 ab	0.25 b	3.85 ab
T ₄	-	1.00	3.85 a	0.30 ab	4.20 a
T ₅	-	1.50	2.65 b	0.20 b	3.15 abc
T ₆	-	2.00	2.70 ab	0.20 b	2.73 bc
CV			23.56	43.35	25.42

*Ácido indolbutírico, **Ácido naftalenacético. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05)

De acuerdo con el análisis no paramétrico de la prueba H de Kruskal y Wallis ($P < 0.05$) en el porcentaje de plantas que emitieron raíces se detectaron diferencias significativas por efecto de los tratamientos, obteniéndose el mejor resultado en el tratamiento T₃ con el 60% superando estadísticamente a los porcentajes producidos en los tratamientos T₀, T₁ y T₄ que fue de 0, 5 y 15% respectivamente.

Los tratamientos T₂, T₅ y T₆ todos con porcentaje del 25% de plantas con raíces poseen un comportamiento estadístico similar al tratamiento T₄. Los resultados de producción de raíces del patrón Citrange carrizo se presentan en la Figura 15 y 16 se observan plantas con raíces y plantas en biorreactores BEIT.

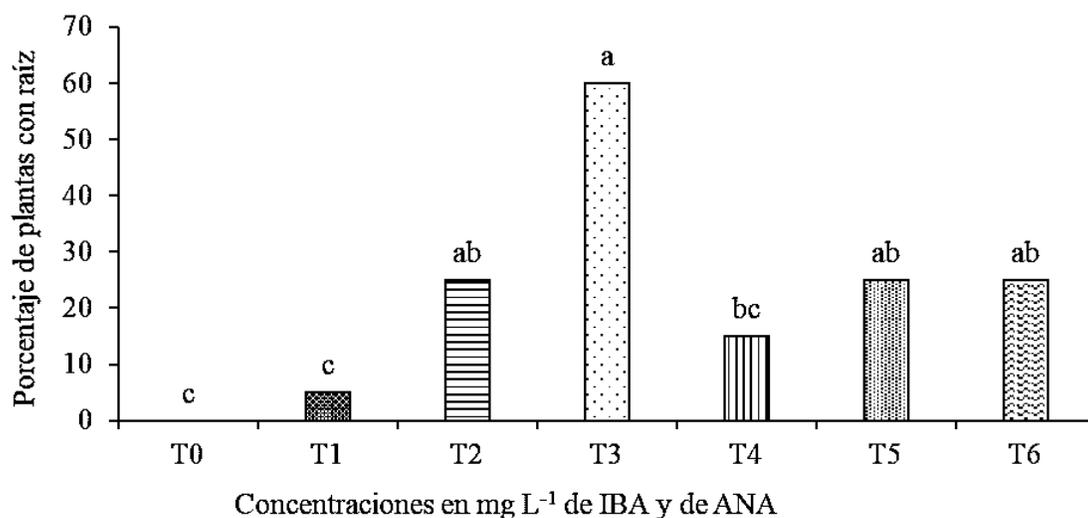


Figura 15. Porcentaje de plantas con raíces del patrón Citrange carrizo a las cuatro semanas. Barras con letras distintas difieren significativamente según prueba Kruskal Wallis, para $p > 0.05$.



Figura 16. Izquierda. Planta del patrón Citrange carrizo en fase de enraizamiento a las cuatro semanas. Derecha. Plantas en BEIT a las seis semanas.

5.3.2 Patrón Citrumelo swingle

En la variable longitud de planta no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos que contenían IBA o ANA en las diferentes dosis adicionadas al medio de cultivo, presentándose medias entre 2.63 y 3.21 cm. El tratamiento T₆ que contenía 2.00 mg L⁻¹ de ANA con media de longitud de planta de 3.21 cm solo superó significativamente a la media de 2.88 cm que se obtuvo en el tratamiento T₀.

La media de número de brotes de 0.85 que se obtuvo en el tratamiento T₀ superó estadísticamente a las medias que se presentaron en los tratamientos que se les adicionaron diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento IBA y ANA, registrándose medias de brotes por planta en estos tratamientos entre 0.10 y 0.55.

No se presentaron diferencias estadísticas entre las medias de número de hojas por efecto de los diferentes tratamientos con o sin adición de IBA o de ANA. Los resultados de las variables longitud de planta, número de brotes y número de hojas se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Efecto del IBA y de ANA en variables de longitud de planta, número de brotes y número de hojas de segmentos nodales del patrón Citrumelo swingle en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de evaluadas

Tratamientos	IBA* (mg L ⁻¹)	ANA** (mg L ⁻¹)	Variables		
			Longitud de planta	Número de brotes	Número de hojas
T ₀	0.00	0.00	2.28 b	0.85 a	2.60 a
T ₁	1.00	-	2.63 ab	0.55 b	2.00 a
T ₂	1.50	-	2.73 ab	0.35 bc	2.35 a
T ₃	2.00	-	2.78 ab	0.30 cd	2.20 a
T ₄	-	1.00	2.79 ab	0.20 cd	2.55 a
T ₅	-	1.50	2.81 ab	0.15 cd	2.25 a
T ₆	-	2.00	3.21 a	0.10 d	2.10 a
CV			14.28	40.53	20.26

*Ácido indolbutírico, **Ácido naftalenacético. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Se presentaron diferencias estadísticas el porcentaje de plantas que emitieron raíces de acuerdo con el análisis no paramétrico de la prueba H de Kruskal y Wallis ($P < 0.05$) que resultó superior en el tratamiento T₆ con el 60 % en comparación a los tratamientos T₀, T₁, T₂ y T₄ que registraron el 10, 20, 25 y 15 % respectivamente. Mientras que con 30 y 35 % de raíces producidas en los tratamientos T₃ y T₅ respectivamente resultaron con similar respuesta estadística al tratamiento T₆. En la Figura 17 se presentan los resultados de producción de raíces del patrón Citrumelo swingle y en la Figura 18 se observa planta con raíz y plantas en biorreactores BEIT.

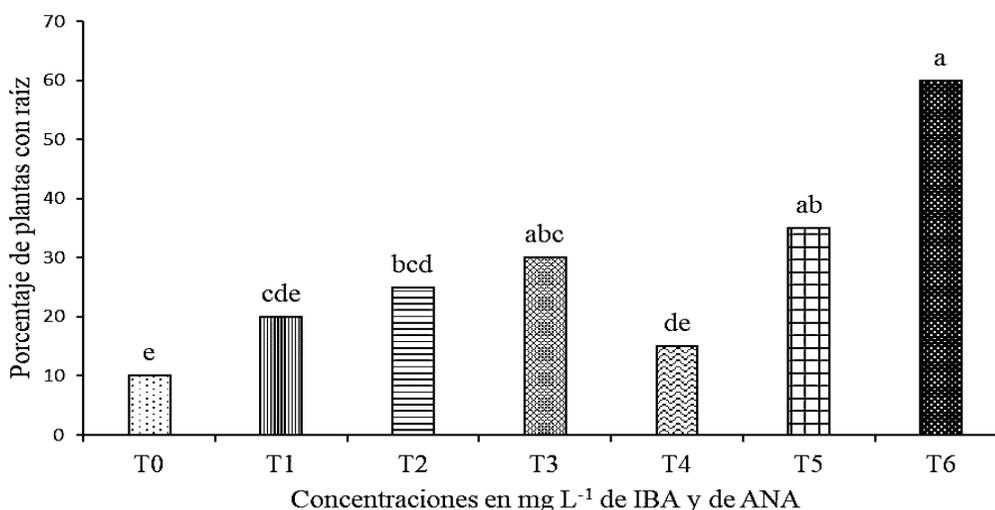


Figura 17. Porcentaje de plantas con raíces del patrón Citrumelo swingle a las cuatro semanas. Barras con letras distintas difieren significativamente según prueba Kruskal Wallis, $p > 0,05$.



Figura 18. Izquierda. Planta del patrón Citrumelo swingle en fase de enraizamiento a las cuatro semanas. Derecha. Plantas en biorreactor BEIT a las seis semanas.

En la fase de enraizamiento del patrón Citrumelo swingle en los tratamientos que contenían dosis de 1.50 y 2.00 mg L⁻¹ de IBA se obtuvieron mejores resultados en las variables longitud de la planta, número de hojas y en el porcentaje de plantas que formaron raíces, a diferencia de la variable brotación axilar que fue menor en relación con los tratamientos sin reguladores de crecimiento y con la adición de 1.00 mg L⁻¹ de IBA. Cuando se agregó 1.00 mg L⁻¹ de ANA se logró la mejor categoría estadística en las variables longitud de planta y producción de hojas, aunque en la variable número de brotes producidos tuvo una respuesta estadística similar a las medias logradas con dosis de 1.50 y 2.00 mg L⁻¹ de ANA.

Por efecto de las 3 dosis de ANA en la variable porcentaje de plantas que presentaron raíces no registraron diferencias significativas entre sí y en comparación al efecto del IBA solamente resultó inferior estadísticamente la media obtenida en el tratamiento que contenía 1.00 mg L⁻¹ de ANA a la media lograda en el tratamiento con 2.00 mg L⁻¹ de IBA.

En el patrón Citrumelo swingle la respuesta estadística de la variable longitud de planta resultó similar entre los tratamientos que se les adicionaron IBA y ANA, pero en la variable número de hojas no se presentaron diferencias significativas entre las medias obtenidas en todos los tratamientos.

Con la adición de 2.00 mg L⁻¹ de IBA fue superior la respuesta estadística en comparación a la media que se obtuvo en el tratamiento sin reguladores de crecimiento y los tratamientos que contenían 1.50 y 2.00 mg L⁻¹ de ANA superaron estadísticamente a las medias logradas en los tratamientos testigo y los que se les adicionaron 1.00 mg L⁻¹ de IBA o de ANA.

En los dos patrones en el tratamiento que no se le agregó IBA o ANA resultó significativamente mejor la media de la variable número de brotes. Este comportamiento es debido a que al no adicionarle al medio de cultivo auxinas sea IBA o ANA no se ejerce el efecto de dominancia apical por tanto la respuesta de los tejidos es estimular la brotación axilar. Sangeeta y Vibha (2010) reportaron en Citrange carrizo que los brotes cultivados en medio sin auxina exhibieron un bajo porcentaje de enraizamiento.

Kitto y Young (1981) experimentando con el patrón Citrange carrizo obtuvieron el mejor resultado en el tratamiento que contenía 1.00 mg L⁻¹ de ANA logrando formaron raíces en el 80% de las plantas y una media de 10.20 raíces por brote superando al efecto que tuvo la adición de las auxinas IBA y AIA.

Hernández *et al.*, (2021) en la fase de enraizamiento del cultivo in vitro de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) con adiciones de 1.00 mg L⁻¹ de IBA y 1.00 mg L⁻¹ de ANA lograron los mejores resultados con el 94.70 % de explantes con raíces. Mientras que Rathore *et al.*, (2007) comprobaron que en el medio de cultivo con las sales MS al 50% y 0.10% de carbón activado más la adición de ANA se induce porcentajes más altos de enraizamiento que con IBA en *Citrus limon*, resultando con la concentración de 5.00 mg L⁻¹ de ANA el 100% de plantas enraizadas y con 4.90 mg L⁻¹ de IBA el porcentaje de enraizamiento fue del 68%. Sukhjit (2016) empleando las sales MS con 0.10 mg L⁻¹ de IBA y 0.50 mg L⁻¹ de AIA reporta la formación de raíces en el 96% de segmentos de epicotilo de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.).

Debido a que muchos autores reportan buenos resultados en la fase de enraizamiento en diferentes especies de *citrus* en la que experimentan con las auxinas AIA, IBA y ANA adicionadas solas o combinadas al medio de cultivo, es necesario que en el caso de los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle se experimente con adiciones combinadas de IBA y ANA para evaluar el efecto sinérgico en el enraizamiento de acuerdo a la respuesta de las variables porcentaje de plantas con raíces y en la cantidad y longitud de las mismas.

VI. CONCLUSIONES

En la fase de multiplicación en biorreactores del modelo BEIT, los patrones Citrange carrizo y Citrumelo swingle presentaron una respuesta superior en número de brotes en el tratamiento que contenía 2.00 mg L^{-1} de 6-BAP con 0.50 mg L^{-1} de GA_3 , resultando superior a las medias registradas tanto en el tratamiento testigo como en el resto de los tratamientos.

El patrón Citrange carrizo con media de 2.80 hojas obtenida en densidad de siembra con 40 segmentos nodales superó significativamente a la media de 2.40 hojas obtenida con densidad de 20 segmentos nodales. En el patrón Citrumelo swingle en densidad de siembra con 40 segmentos nodales con media de 2.95 hojas resultó superior la media de 2.55 hojas obtenida con densidad de siembra de 20 segmentos nodales.

En la fase de enraizamiento en biorreactores del modelo BEIT, en el patrón Citrange carrizo se obtuvieron los mejores resultados en el tratamiento que contenía las sales MS con 2.00 mg L^{-1} de IBA de acuerdo con las variables longitud de planta, número de hojas y porcentaje de plantas con raíces, mientras que en el patrón Citrumelo swingle en esas mismas variables la mejor respuesta fue en el tratamiento que contenía las sales MS con 2.00 mg L^{-1} de ANA.

VII. RECOMENDACIONES

Analizar el efecto en la micropropagación en biorreactores de los siguientes factores: cantidad de medio de cultivo por explante, concentración de las sales del medio de cultivo, concentración de reguladores de crecimiento, frecuencia y tiempo de inmersión.

Experimentar en la fase de enraizamiento con las auxinas IBA y ANA adicionadas en combinación y en diferentes concentraciones para evaluar si existe efecto sinérgico que estimule significativamente la inducción de raíces de calidad.

VIII. LITERATURA CITADA

- Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A. M. (2001). *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Current Science*, 81: 1242-1246.
- Arango, L.A; Orduz, J; León, G. (2009). Patrones para cítricos en los Llanos Orientales de Colombia. Corpoica. p. 12. file:///C:/Users/Tonys/Downloads/PatronesparacitricosenlosLlanosOrientalesdeColombia.pdf.
- Artiles Fajardo, Y. J. (2021). Propagación de cítricos (*Citrus* spp.) a través de técnica de injerto, Centro de Experimentación y Validación de Tecnología, El Plantel, UNA, Masaya, 2020 [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio IN. <https://repositorio.una.edu.ni/4301/1/tnf02a787.pdf>
- Bar-Joseph, M.; R. Marcus and R. F. Lee. 1989. The continuous challenge of *Citrus* tristeza virus control. *Annu Rev Phytopathol.* 27: 291–316.
- Bello-Bello J.J, Schettino-Salomón S, Ortega-Espinoza J, Spinoso-Castillo JL. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech.* 11(10):437. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-021-02984-5>.
- Bordón, Y; Guardiola, J. L and García-Luis, A. (2000). Genotype Affects the Morphogenic Response *in vitro* of Epicotyl Segments of Citrus Rootstocks. *Annals of Botany* 86: 159-166.
- Bornman, C.H. 1993. Micropropagation and somatic embryogenesis. In: *Plant Breeding: principles and prospects.* (eds.) M.D.Hoyward; N.O. Bosemark and I. Romagosa, p. 246-260.
- Brunt, A.A.; Crabtree, K.; Daliwitz, M.J.; Gibbs, A.J.; Watson, L. and Zurcher. (1997). "Plant Viruses".
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiI-b6a_tD_AhUaUjABHccnCA0QFnoECBQQAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.sciepub.com%2Freference%2F45092&usg=AOvVaw223HStKsyLve-fbwk83FNn&opi=89978449
- Bulbarela-Marini, J.E., Gómez-Merino, F., Galindo-Tovar, M.E. *et al.*, (2019). The *in vitro* propagation system of *Citrus × latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (*Rutaceae*) affects the growth and depletion of nutriment. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 55, 290–295 <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09976-4>
- Cacho, M; Morán, M; Herrera, M.T; Fernández-Tárrago, J; Corchete, M.P. (1991). Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 25: 117-123.

- Cambra M, Moreno P (2000) Tristeza En: Enfermedades de los cítricos (Durán-Vila N, Moreno P, Eds). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, pp. 77-81.
- Calavan, E. C., C. N. Roistacher and E. M. Nauer. (1972). Thermoherapy of *citrus* for inactivation of certain viruses. Disponible en http://www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsVII/7th186_193.pdf
- Carimi, F, De Pasquale F. (2003). Micropropagation of *Citrus*. En: Jain SM y Ishii K (Eds) Micropropagation of woody trees and fruits, pp 589 _ 619. Kluwers Academic Publisher. Dordrecht.
- https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-010-0125-0_20
- Castro, D.; Díaz, J and Montoya, N. 2002. Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary immersion. Memorias XV Reunión: Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología. p. 44-48.
- Cruz, F. (2012). Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. 42 p. https://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf.
- Debergh, P.C and Zimmerman, R. H. (1991). Micropropagation. Technology and application. Kluwer Academic publishers. Dordrecht, The Netherlands. 7: 1-93.
- Devlin, R. M. 1980. Fisiología Vegetal, (Ed.). Omega Barcelona, España.
- Dhatt, A.S. and Singh, Z. 1993. "Propagation and rootstocks of citrus". In Advances in horticulture, Vol. 2—Fruit crops: Part 2, Edited by: Chadha, K.L. and Pareek, O.P. 523–550. New Delhi, India: Malhotra Publishing House.
- Dodds, J and Roberts L, W.1984. Experiments in plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge, London, New York, p. 21-35.
- Dublín, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café y cacao. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. (Eds.) Roca W.M y Mroginski, L.A: 26:278-619.
- George, E. F. and Klerk, G. J. 2008. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. En: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Vol. 1 The Background. George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk G.-J. (eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 65-113.
- George E.F. (2008). Types of tissue culture. En: George EF, Hall MA, Klerk G-J de, editores. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Vol. 1. 3^a ed. Dordrecht, Países Bajos: George, Edwin F; Hall, Michael A; Klerk, Geert-Jan de. p. 8–9.

- George, E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington, England. 574 pp.
- Germaná, M. A; Micheli, M; Chiancone, B; Macaluso, L; Standardi, A. (2011). Organogenesis and encapsulation of *in vitro* derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 106. 299-307.
https://www.researchgate.net/publication/252746528_In_Situ_Load_Experimental_Research_on_the_Stress_Characteristics_of_Large_Span_Aqueduct.
- Ghosh, D.K. (2001). “Viral diseases of citrus and bud wood certification programme”. In *Citrus*, Edited by: Singh, S. and Naqvi, S.A.M.H. 409–448. Lucknow, India: International Distributing Company.
<https://journals.ashs.org/hortsci/downloadpdf/journals/hortsci/21/3/article-p518.xml>
- Hahn E. J., Paek K. Y. (2005). Multiplication of chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81, 301–306. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11240-004-6655-0.pdf>.
- Hartmann, H and Kester, D. (1995). Propagación de plantas. Principios y prácticas. 4ª ed. Continental. México. 760 p.
- Hasan, M; Hasan, M; Foysal, S; Hoque, H; Khan, M; Bhuiyan, M; Prodhan, S. (2019). *In vitro* Regeneration of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from Mature Seed Derived Embryogenic Callus on Different Solid Basal Media. *American Journal of Plant Sciences*. 10 (2): 285-297.
- Hernández, A; Pineda, A; Rojas, J; Díaz, H. (2021). Regeneración *in vitro* de arnaucho (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de yemas apicales. *Manglar*, 18(1): 71-75.
<https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/222>
- Hernández-Amasifuen, A. D; Pineda-Lázaro A.J; Hermila Belba Díaz-Pillasca, H.B. (2021). Micropropagación *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) a partir de segmentos nodales. Volumen 6 Número 4.
<http://www.revistabionatura.com>
- Hernández Jerez, Y., Silva Pupo, J., y Borges García M. (2013). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. ‘mexicana’ a partir de semillas. *Ibp*, 13 (3), 181 – 187.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/116/474>
- Herrera-Flores J. R., Caamal-Velázquez J. H., Ramírez-Bení-tes J. E. y Gutiérrez-Espinosa M. A. (2017). Establecimiento *in vitro* de limón persa (*Citrus latifolia* Tan.) y su propagación masiva. Campeche: Colegio de Posgraduados.

- Hosein, M, Sohani M, Hatamzadeh, A; Reza M. (2013). *In vitro* regeneration of sour orange (*Citrus aurantium* L.) via direct organogenesis Plant Knowledge Journal 2(4):150-156. http://www.sciencej.com/sohani_2_4_2013_150_156.pdf
- Hurtado, D. M y Merino, M. E. (1994). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas S.A. de C.V. México. 233 p.
- Ibáñez, V.; Lopez-García, A.; Carbonell-Caballero, J.; Alonso, R.; Terol, J.; Dopazo, J.; Talón, M. (2015). El origen de las especies cultivadas de cítricos. Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada (Valencia), España. Revista Levante agrícola. Edición 2º Trimestre. Recuperado en 26 de octubre de 2021, de http://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/4176/2015_Iba%C3%B1ez_El%20Origen.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Instituto Nacional de Información de Desarrollo. (2012). Informe Final IV Censo Nacional Agropecuario [Archivo PDF]. file:///E:/Informe%20Final%20IV%20CENAGRO.pdf
- Jiménez, E. (1998). Cultivo de ápices y meristemos. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp. 45-56.
- Jin, M. Y; Piao, X. C; Xiu, J. R; Park, S. Y; Lian, M. L. (2013). Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock ‘5BB’. *Sci. Hortic.* 164, 35–40. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423813004639>.
- Kanwar, J., Godara, S., Kaul, M. K., & Srivastava, A. K. (2013). Micro propagation of carrizo (*Citrus carrizo*) through mature bud culture. *Agricultural Science Digest-A Research Journal*, 33(2), 109-113.
- Kaur, S. 2016. *In vitro* plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) through epicotyl segments by direct shoot organogenesis. *Journal of Applied and Natural Science* 8 (2): 724 -729. <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/865/824>.
- Kitto, S.L, Young, M.J (1981). *In vitro* propagation on Carrizo citrange. *Hort Science* 16:305–306.
- Litz, R.E. y R.L. Jarret. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. En: W. Roca y L.A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cap. 7. CIAT. Colombia: 143-172.
- Lugo Espinosa, O; Arellano Ostoa, G y Hernández Cote, D. (2017). Automatización de un sistema de inmersión temporal con base en plataformas abiertas de hardware y software. *Terra Latinoamericana*, 35(3), 269 – 277. <https://www.redalyc.org/journal/573/57352066008/html/#B5>.
- Machakova, I; Zazimalova, E and George, E.F. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. En: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd*

Edition, Vol. 1 The Background. George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk G.-J. (eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 175-204.

Martín, R; Chong-Pérez, B; Pérez-Alonso, N. (2015). Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. *Biotecnología Vegetal* Vol. 15, No. 4:195 – 206. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV, Cuba. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/497/html>.

Martínez-Hernández, M. J; López, A. A; Osorio-Acosta, F; Gallardo López, F y Mata Rosas, M. (2006). Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800013.

Martínez González, G. A., Munguía Hernández, N. U. (2021). Uso de cuatro técnicas de injertación en dos patrones trifoliata, y su efecto en el prendimiento de yemas de lima Tahití (*Citrus Latifolia* L.) [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria]. <file:///E:/TESIS/Guia-Normas-APA-7ma-edicion.pdf>.

Méndez, M; Caamal, J; Rodríguez, N; Vargas, A; Alamilla, J; Criollo, M. (2020). Avances y limitantes en la micropropagación del limón persa (*citrus x latifolia* Tan.). *Temas de ciencia y tecnología*. [https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas72/5_Avances%20y%20limitantes%20en%20la%20micropropagaci%C3%B3n%20del%20lim%C3%B3n%20persa%20\(citrus%20x%20latifolia%20Tan.\).pdf](https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas72/5_Avances%20y%20limitantes%20en%20la%20micropropagaci%C3%B3n%20del%20lim%C3%B3n%20persa%20(citrus%20x%20latifolia%20Tan.).pdf).

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

Murthy, H.N, Joseph, K.S, Paek, K.Y, Park, S.Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in plant science*. Vol.14.

https://www.researchgate.net/publication/370214751_Bioreactor_systems_for_micropropagation_of_plants_present_scenario_and_future_prospects.

Navarro González, J. E. (2019). Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) del cultivar CCO6-791 [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Archivo digital. <https://repositorio.una.edu.ni/3821/1/tnf02n322.pdf>.

OIRSA. (2019). Nicaragua: plantas sanas del vivero de OIRSA disponible para productores. *Boletín Regional*. Número 57. <https://www.calameo.com/read/004909973eb6c8717ec22>.

Orduz, R., Javier Orlando; León, Guillermo A.; Arango W., Laura Victoria. (2009). Patrones para cítricos en los Llanos Orientales de Colombia. *Corpoica*. 12 p. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2209/44227_56496.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

- Orellana, P. (1998). Introducción a la Propagación masiva. En Propagación y Mejora Genética de las plantas por biotecnología (Ed.) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba, p. 151 -178.
- Orozco, S.M. (1996). Enfermedades de los cítricos en México. Memorias sobre sistemas de producción de cítricos. Universidad Autónoma Chapingo, PIISCI, pp. 115-128.
- Padrón, J.E. (1991). Uso de patrones alternativos al naranjo agrio para naranja y limón. En: Memorias del Primer Curso Internacional de Citricultura. PIISCI. Martínez de la Torre, Ver. Marzo. Pp.33-36.
- Paniagua, B. K. (2015). Manejo agronómico en cítricos (Nicaragua). Slideshare. <https://es.slideshare.net/kennerpaniagua/manejo-agronomico-en-ctricos-nicaragua>.
- Pérez-Alonso N; Jiménez, E; De Fera, M; Capote, A; Barbon R; Quiala, E and Chávez, M. (2007). Effect of inoculum density and immersion time on the production of potato microtubers in temporary immersion systems and field studies Biotecnol. Veg. 7 149–54. <https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnologiavegetal/2007/vol7/no3/4.pdf>
- Pérez-Tornero, O; Tallo, C.I; Porras, I. (2009). An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. Plan cell Tissue and Organ Culture: 112:101-108.
- https://www.researchgate.net/publication/225491051_An_efficient_protocol_for_micropropagation_of_lemon_Citrus_limon_from_mature_nodal_segments.
- Pérez, J.N; E. Jiménez y Agramonte. D. (1998). Aumento de la Eficiencia de la Propagación Masiva: En Propagación y Mejora Genética de las plantas por biotecnología (e d.) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba, pp. 179 -190.
- Phillips R.C. (2004). *In vitro* morphogenesis in plants - recent advances. *In vitro* Cell Dev-Plant. 40:342-345.
- Piqueras, A & Debergh, P. (1999). Morphogenesis in micropropagation. In Morphogenesis in Plant Tissue Cultures / Soh WY and Bhojwani SS (Eds.). - Kluwer Academic Publishers, (pp. 443–462).
- Polzin, F; Sylvestre, I; Déchamp, E; Ilbert, P; Etienne, H & Engelmann, F. (2014). Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis* - rotundata) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 50(2), 210-216. [file:///C:/Users/Tonys/Downloads/s11627-013-9552-6%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Tonys/Downloads/s11627-013-9552-6%20(1).pdf).
- Preil, W. (1991). Application of bioreactor in plant propagation, pp. 425-445. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic, Boston.
- Rathore, J.S; Rathore, M.S; Singh, M; Singh, R.P; Shekhawat, N.S. (2007). Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. Indian J. Biotechnol. 6: 239–244.

- Rojas, S. (2001). Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC). Tesis en maestría en biotecnología de plantas. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 85p. <https://www.uv.mx/iif/files/2014/10/TESISPaua-version-final-MC.pdf>.
- Ruíz-Ruíz, S. (2009). El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España. 258 p. <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/15848/RUIZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Sangeeta, S and D. Vibha. (2010). Development of a Highly Efficient Micropropagation Method for the Citrus rootstock 'Swingle' Citrumelo [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *C. paradisi* McFaden]. International Journal of Fruit Science 10:65–78. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/15538361003676801>.
- Santiana, W.R. (2014). Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares. Tesis de grado de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 20 P. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/ffc39c29-c3a6-4322-ad7c-db1f4e0db468/content>.
- Sharry, S; Adema, M y Abedini, W. (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
- Sukhjit Kaur, S. (2016). *In vitro* plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) through epicotyl segments by direct shoot organogenesis. Journal of Applied and Natural Science 8 (2): 724 – 729.
- Tallón, C.I; Córdoba, F; Porras, I; Pérez-Tornero, O. (2015). Efficient *in vitro* propagation and rooting of adult explants of *citrus* rootstocks. Acta Hort. 1065:649–656. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.81>.
- Teisson, C and D. Alvard. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: temporary immersion. In: VIII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, pp. S2-2, Abstract.
- Vanegas, L.A y Araúz, P. G. (2023). Micropropagación de piña cv. MD-2 (*Ananas comosus* L. Merrill) en dos modelos de biorreactores. Trabajo de Tesis. Universidad Nacional Agraria, UNA, Managua, Nicaragua. 55 p.
- Varela González, F. (2018). Importancia y distribución de los cítricos. Tecnoagro. <https://tecnoagro.com.mx/no.-124/importancia-y-distribucion-de-los-citricos>.

- Varela-González, F. (2015). Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México. Maestría en ciencias en producción agrícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. p. 28. Recuperado en 26 de octubre de 2021, de <http://eprints.uanl.mx/9706/1/1080259495.pdf>.
- Vázquez, B.E y Torres, S. 1995. Fisiología vegetal. Crecimiento y desarrollo. (ed.) Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana, pp. 317-362.
- Woodward, A.W and Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mci083>