

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**“EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TERMOTERAPIA Y
MICROINJERTO *in vitro* DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS
DE ‘LIMÓN PÉRSICO’ (*Citrus latifolia* Bearss.), SOBRE
DIFERENTES PORTAINJERTOS EN EL SALVADOR”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JEREMÍAS EZEQUIEL YANES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, AGOSTO DE 2004.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**“EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TERMOTERAPIA Y
MICROINJERTO *in vitro* DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS DE
'LIMÓN PÉRSICO' (*Citrus latifolia* Bearss.), SOBRE
DIFERENTES PORTAINJERTOS EN EL SALVADOR”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JEREMÍAS EZEQUIEL YANES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

ASESORES:

**M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA
Ing. Agr. JOSÉ MANUEL CUÉLLAR ZOMETA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, AGOSTO DE 2004.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**“EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TERMOTERAPIA Y
MICROINJERTO *in vitro* DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS DE
'LIMÓN PÉRSICO' (*Citrus latifolia* Bearss.), SOBRE DIFERENTES
PORTAINJERTOS EN EL SALVADOR”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JEREMÍAS EZEQUIEL YANES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

ASESORA: M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ _____

ASESOR: Ing. Agr. JOSÉ MANUEL CUÉLLAR _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, AGOSTO DE 2004.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTORA

Dra. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ

SECRETARIA GENERAL

Licda. ALICIA MARGARITA RIVAS DE RECINOS

FISCAL GENERAL

Lic. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

Dr. JOSÉ HÉCTOR ELÍAS

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, AGOSTO DE 2004.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Contenidos	5
Índice de Tablas	12
Índice de Gráficos	13
Agradecimientos	15
Dedicatoria	17
Resumen	18
Introducción	20
1. Fundamento Teórico	22
1.1 Antecedentes Históricos de Los Cítricos.....	22
1.2 Hábitat de Los Cítricos	23
1.3 Floración de Los Cítricos	23
1.4 Los Cítricos y su Fruto.....	24
1.5 Nomenclatura Botánica	24
1.6 Morfología de Los Cítricos.....	25
1.6.1 Forma de los Arbustos.....	25
1.6.2 Hojas.....	25
1.6.3 Brotes.....	26
1.6.4 Raíces.....	27
1.6.5 Flores y Frutos.....	27
1.7 Propagación de los Cítricos.....	28
1.8 Poliembrionía en la Propagación Comercial de los Cítricos	29

1.9 Semillas, Agua y Solutos	31
1.10 Dormancia de Las Semillas	32
1.11 Patrones de Crecimiento en Yemas	32
1.12 Nutrición y Control Ambiental	
en el Crecimiento de Yemas.....	32
1.13 Reguladores de Crecimiento Vegetal en Cítricos	33
1.13.1 Auxinas	33
1.13.2 Citoquininas	34
1.13.3 Giberelinas	34
1.13.4 Ácido Abscísico.....	36
1.13.5 Etileno.....	36
1.13.6 Otros Componentes.....	37
1.14 Cultivo de Limón Pérsico en El Salvador	37
1.15 Situación Actual del Cultivo de “Limón Pérsico” en	
El Salvador.....	38
1.16 Descripción Botánica de Limón Pérsico	38
1.17 Clasificación taxonómica de “Limón Pérsico”	39
1.18 Principales Enfermedades Virales Presentes en	
“Limón Pérsico” en El Salvador	39
1.18.1 Tristeza de los Cítricos.....	39
1.18.2 Psorosis.....	40
1.18.3 Exocortis.....	41
1.18.4 Xiloporosis	41

1.19 Aplicación de Biotécnicas en el Mejoramiento	
de los Cítricos.....	42
1.19.1 Cultivo de Tejidos en el	
Mejoramiento de Cítricos	43
1.19.2 Banco de Germoplasma	44
1.19.3 Cultivo de Tejidos en la Propagación de Cítricos	45
1.19.4 Medio de Cultivo	45
1.19.5 Factores Físicos	47
1.20 Organización del Meristemo Apical y Regeneración	
de Plántulas Obtenidas por Cultivo <i>in vitro</i>	47
1.21 Cultivo <i>in vitro</i> de Meristemas	49
1.22 Aplicaciones del Cultivo de Meristemas	50
1.23 Obtención de Plantas Libres de Virus	50
1.23.1 Importancia de la Termoterapia	
en la Eliminación de Virus	51
1.23.2 Importancia de la Microinjertación <i>in vitro</i>	52
1.24 Importancia de los Patrones Utilizados	54
1.24.1 Características Esenciales de un Buen Patrón	55
1.24.2 Citranges Troyer y Carrizo.....	56
1.24.3 Mandarina Cleopatra	58
1.24.4 Swingle Citrumelo.....	59
1.24.5 <i>Citrus volkameriana</i> Pasquale	60
1.25 Enraizamiento <i>in vitro</i> de Portainjertos	60

2. Objetivos	62
3. Planteamiento de Hipótesis	63
4. Metodología	64
4.1 Ubicación y Descripción del Área de Estudio.....	64
4.2 Material Vegetativo.....	64
4.3 Primera Fase Experimental	65
4.3.1 Preparación de Medios de Cultivo.....	65
4.3.2 Modificaciones a los Medios de Cultivo	65
4.4 Segunda Fase Experimental	66
4.4.1 Desinfección <i>in vitro</i> de Semillas por Inmersión en Solución de Hipoclorito de Sodio	66
4.4.2 Siembra y Germinación <i>in vitro</i> de Semillas de Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i> Hort), Citrumelo, <i>Citrus volkameriana</i> y Citrange carrizo para Obtener el Portainjerto.....	68
4.5 Tercera Fase Experimental	69
4.5.1 Obtención de Varetas para Germinación de Yemas.....	69
4.5.2 Desinfección <i>in vitro</i> de Microestacas	69
4.5.3 Siembra <i>in vitro</i> de Varetas.....	71
4.5.4 Aplicación de Termoterapia a Varetas de “Limón Pérsico” (<i>Citrus latifolia</i> Bearss	72
4.5.5 Aislamiento y Extracción de Meristemas.....	74

4.6 Cuarta Fase Experimental	75
4.6.1 Microinjertación <i>in vitro</i> de Ápices Meristemáticos	75
4.6.2 Siembra <i>in vitro</i> de Plántulas Microinjertadas.....	76
4.7 Quinta Fase Experimental	78
4.7.1 Criterios de Evaluación.....	78
4.7.2 Variables en Estudio.....	78
4.7.3 Otras Variables Consideradas	78
4.7.4 Factores Constantes.....	79
4.7.5 Unidad Experimental.....	79
4.7.6 Observaciones	79
4.8 Análisis Estadístico.....	80
5. Resultados	81
5.1 Germinación <i>in vitro</i> de Citrumelo	81
5.2 Germinación <i>in vitro</i> de Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i> Hort. ex. Tan.	81
5.3 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Citrus volkameriana</i>	81
5.4 Germinación <i>in vitro</i> de <i>Citrango carrizo</i>	82
5.5 Porcentajes de Contaminación <i>in vitro</i> de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i> Hort.) y <i>Citrus volkameriana</i> utilizadas como patrón para microinjerto al final de la evaluación	82

5.6 Porcentajes Necrosamiento <i>in vitro</i> de de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i> Hort.) y <i>Citrus volkameriana</i> utilizadas como patrón para microinjerto al final de la evaluación.....	82
5.7 Porcentajes de Germinación <i>in vitro</i> de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i> Hort.) y <i>Citrus volkameriana</i> utilizadas como patrón para microinjerto.	84
5.8 Mejores porcentajes de Germinación <i>in vitro</i> de los cuatro patrones utilizados como patrón para microinjerto al final de la evaluación.	84
5.9 Porcentaje de Germinación <i>in vitro</i> de Yemas	84
5.10 Microinjertación <i>in vitro</i> de Ápices Meristemáticos y Prendimiento de Microinjertos.....	86
5.11 Coloración de las Hojas	87
5.12 ANDEVA y Separación de Medias de la Germinación <i>in vitro</i> de Patrones	89
5.13 ANDEVA y Separación de Medias de la Germinación <i>in vitro</i> de Varetas	90
6. Discusión y Análisis de Resultados	91
6.1 Contaminación <i>in vitro</i> de Patrones	91
6.2 Germinación <i>in vitro</i> de Patrones	92
6.3 Aplicación de Termoterapia <i>in vitro</i>	95

6.4 Oxidación de los Patrones Microinjertados y Muerte de Meristemas	99
6.5 Prendimiento del Microinjerto	102
6.6 Crecimiento (cm.) del Microinjerto	107
6.7 Número de Hojas del Microinjerto	109
6.8 Color de Hojas del Microinjerto	112
7. Conclusiones	113
8. Recomendaciones	116
9. Referencias Bibliográficas	118
Apéndices.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Medios Utilizados en las Fases Experimentales	66
Tabla No. 2. ANDEVA de la Germinación <i>in vitro</i> de Patrones	89
Tabla No. 3. Separación de Medias de la Germinación <i>in vitro</i> de Patrones	89
Tabla No. 4. ANDEVA de la Germinación <i>in vitro</i> de Varetas	90
Tabla No. 5. Separación de Medias de la Germinación <i>in vitro</i> de Varetas	90

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico No. 1.** Porcentajes de Contaminación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizados como patrón para microinjerto al final de la evaluación.....83
- Gráfico No. 2.** Porcentajes de Contaminación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizados como patrón para microinjerto al final de la evaluación.....83
- Gráfico No. 3.** Germinación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizados como patrón para microinjerto.....85
- Gráfico No. 4.** Mejores Porcentajes de Germinación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizados como patrón para microinjerto.....85
- Gráfico No. 5.** Porcentajes de Germinación *in vitro* de Yemas a lo largo de todas las Fechas de Evaluación86
- Gráfico No. 6.** Porcentajes de Prendimiento de Microinjertos en los Diferentes Patrones Utilizados.....87
- Gráfico No. 7.** Promedio del Número de Hojas de los Microinjertos al Final de la Evaluación.....88
- Gráfico No. 8.** Promedio del Color de Hojas de los Microinjertos Exitosos88

AGRADECIMIENTOS

“Amo a Jehová, pues ha oído mi voz y mis súplicas; porque ha inclinado a mí su oído...”

Salmos 116: 1.

A través de este apartado, deseo agradecer con todo mi amor y mi vida como testimonio, a las siguientes personas:

Dios Todopoderoso

Porque sin su amor, misericordia, perdón, renovación y redención, este logro no habría sido posible, pues mis fuerzas y todo lo que me rodea, serían inútiles.

A mi hermano Ronny Iván Yanes

Por su incondicional apoyo y porque este esfuerzo es tan suyo como mío.

A mi asesor Ing. Agr. José Manuel Cuéllar Zometa

Por todas sus enseñanzas, por el esfuerzo y apoyo brindado durante mi estancia en el Laboratorio de la ENA.

A mí tutor, pero sobre todo amigo, M.Sc. José Rafael Vega López

Por ser más que un maestro para mí, por su amistad y por enseñarme a descubrir, conocer y amar el maravilloso mundo de la Biotecnología Vegetal.

A mi asesora M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura

Por su amistad y gran dedicación a mi formación como profesional, sobre todo como Biólogo.

M.Sc. Mario Antonio Orellana Núñez

Por fungir como observador y enriquecer con su valiosa e insustituible experiencia el desarrollo de este trabajo.

Al Director General de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez”,
Ing. Ever Adalberto Quiñónez Basagoitia.

Por brindarme un espacio para hacer mi tesis en las instalaciones de la ENA.

Ing. Fidel Ángel Parada, encargado del Banco de Germoplasma de CENTA.

Por toda su ayuda, amabilidad y disposición en todos y cada uno de los momentos en que le busqué.

To Yukako Gamaike, Voluntary of JICA-JOVC.

For all their support, trust and human greatness during their stay like voluntary in the ENA.

A mi amigo y hermano Jorge Alberto Reyes Crespín

Porque solo un hermano apoya a otro ser humano con la pasión, el amor y la fe con que vos lo hiciste conmigo.

A mi amigo incondicional Manuel Antonio Hernández

Porque gracias a la verdad, nobleza y sentido humano que te caracteriza me enseñaste y me hiciste comprender que “...Cuando escriban la vida los buenos, al final vencedores, se sabrá que no damos veneno con aroma de flores...”.

A Luis Angel Ramírez Benítez

Porque la grandeza humana que te caracteriza siempre nos inspiró a querer ser mejores personas.

A mi amiga Carmen Cecilia Martínez Turcios

Por tu amistad, confianza y verdad profesada hacia mi persona y sobre todo porque tu sonrisa y la luz de tus ojos transformaron en más de una ocasión una cara de angustia en alegría.

A Jesús Consuelo Roque (“Doña Con”)

Porque cada día de mi estancia en la ENA fue iluminado con su calidez y grandeza humana.

A mis amigos Alex Alas y Armando Presa Meléndez, por su valiosa ayuda, además de su inestimable compañerismo.

DEDICATORIA

“Fortaleza mía, a ti cantaré; porque eres, oh Dios, mi refugio, el Dios de mi misericordia”

Salmos 59: 17.

Desde el fondo de mi corazón, dedico este logro a las siguientes personas:

Dios Todopoderoso

Porque su infinita misericordia me ha guardado desde que me llamó y me ha sostenido a lo largo de toda mi vida.

A mi hermano Ronny Iván Yanes

Porque juntos logramos a través de mi persona enorgullecer nuevamente a la familia.

A Rosa Guadalupe Díaz (Lupita)

Porque la muerte no tiene lugar en un corazón que ama la vida con fe y esperanza.

RESUMEN

Como una alternativa para innovar y producir frutales de alta calidad fitosanitaria en El Salvador, en el Departamento de Biotecnología de la Escuela Nacional de Agricultura "Roberto Quiñónez" (ENA) se evaluaron las Técnicas de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos de 'Limón Pérsico' (*Citrus latifolia* Bearss.) sobre patrones de "Mandarina Cleopatra" (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.), *Citrus volkameriana*, Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*). El material vegetativo se sometió a las fases de desinfección, germinación *in vitro* de semillas, termoterapia aplicada a varetas y aislamiento y microinjertación *in vitro* de ápices meristemáticos. En la desinfección del material vegetativo utilizó Hipoclorito de Sodio (0.2% para semillas; 0.5% para varetas) más Tween 20, durante 10 minutos. La germinación, desarrollo e incubación *in vitro* de semillas se llevó a cabo sembrándolas individualmente en medio Murashige & Skoog Basal (1962), sin azúcar ni vitaminas, solidificado con 1.2 gL⁻¹ de phytigel; se incubaron a temperatura constante (27°C) en condiciones de completa oscuridad durante 3 semanas. Las plántulas que medían de 3-5 centímetros de longitud y de 1.6-1.8 milímetros de diámetro fueron utilizadas como patrón. La Termoterapia fue aplicada a las varetas dentro de una Cámara Versátil de Clima programada a 32°C, las 24 horas del día, y 1,600 lux de iluminación, por un periodo de 3 semanas. El aislamiento y microinjertación del ápice meristemático se hizo con la ayuda de un microscopio estereoscópico dentro de la cámara de flujo estéril, este medía de 0.1-0.2 mm y fue aislado y extraído de las yemas germinadas que alcanzaron 8.0 a 10.0 mm; inmediatamente se extrajeron las semillas germinadas en condiciones estériles y se decapitaron alrededor de 1.5 cm. del epicótilo, el ápice meristemático se colocó en una escisión hecha a la corteza del epicótilo en forma de T invertida a 1.0 milímetro de longitud de la

incisión vertical y de 1-2 milímetros en dirección al corte horizontal. Las plántulas microinjertadas fueron cultivadas en un medio líquido de Murashige & Skoog modificado con Vitaminas de White, se colocaron entre un papel filtro perforado en su centro el cual sirvió como soporte en el tubo de vidrio de manera que el sistema radical quedó en contacto con el medio. Las plántulas se llevaron al cuarto de crecimiento en donde permanecieron dos semanas sometidas a temperatura constante (27°C), con un fotoperíodo de 16 horas diarias y 1,600 lux de iluminación, transcurrido ese tiempo se pudo apreciar el crecimiento del ápice microinjertado. Las observaciones se realizaron cada dos semanas durante cinco meses de evaluación. Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente mediante el programa SX STATISTIX Versión 3.5 (Analytical Software, 1985-1991), la prueba empleada fue un Análisis de Varianza (ANDEVA) para cada uno de los factores a evaluar con un nivel de significancia de $< 0.01\%$. Los cuatro patrones utilizados para microinjerto presentaron diferencias marcadas durante la germinación *in vitro* (Carrizo 56.7%, *Citrus volkameriana* 27.5%, Citrumelo 14.2% y Mandarina Cleopatra 1.6%). El promedio de germinación de yemas como producto de la Termoterapia aplicada a las varetas registró aumento en la germinación a medida que las fechas de siembra avanzaban. Referente al número de microinjertos logrados al final de la evaluación, se observó al patrón Carrizo como el único que presentó evidencias de prendimiento de microinjertos en comparación a los patrones *Citrumelo*, Mandarina Cleopatra y *C. Volkameriana*; para el caso, los porcentajes de germinación resultaron ser directamente proporcionales al microinjerto. El ANDEVA y la comparación de medias aplicados a la germinación *in vitro* de patrones y varetas reflejó un error de 0.0000 resultando en ambos casos ser altamente significativo.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un creciente interés por reactivar el cultivo de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) en El Salvador. En ese contexto, una serie de iniciativas lideradas por los mismos productores se han realizado teniendo como base la fundación de APLES¹.

APLES propuso un convenio de cooperación mutua a la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA), para iniciar lo más pronto posible la propagación masiva de plantas de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) libres de virus, utilizando técnicas de Biotecnología Vegetal, específicamente de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales.

El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en coordinación con OIRSA², además del apoyo financiero de la República de China, se encuentra ejecutando el Proyecto VIFINEX³ el cual ha centrado su actividad en el “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) con el objetivo de establecer un sistema autofinanciable y eficiente de inspección fitosanitaria que reduzca los problemas sanitarios y cuarentenarios.

En el año 2002, “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) fue escogido como uno de los cinco rubros frutícolas a promover para la exportación, para lo cual se brinda asistencia técnica y crediticia a los productores interesados en incursionar en este rubro. Dentro de este esfuerzo, el IICA⁴ es el responsable de ejecutar el Programa Integral de Frutas, brindando asistencia técnica a los productores para potenciar la investigación y fomentar así una agricultura

1 Asociación de Productores de Limón Pérsico de El Salvador.

2 Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.

3 Proyecto Regional de Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional.

4 Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

preventiva; además, el CENTA⁵ ha trabajado en la elaboración de un manual de manejo agronómico de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.), mientras la DGSVA⁶ tiene a su cargo la asistencia técnica de parte del MAG.

Desde el punto de vista del mejoramiento del estado de las plantas y del mejoramiento genético, el cultivo de tejidos ha hecho una contribución importante en la citricultura debido a que la aplicación de biotécnicas en la agricultura se ha podido enmarcar en el mejoramiento de la calidad de las plantas así como en el desarrollo de su capacidad genética para conferirles resistencia a plagas y enfermedades; así también, en el desarrollo de plantas en condiciones adversas de la naturaleza (Kuan & Ospina, 1990; Peters, 1993), lo que a su vez ha permitido que algunas técnicas como la termoterapia y microinjertación de ápices meristemáticos limpien de virus todo tipo de material vegetativo que se comercializa y consume en todo el mundo, esto con algunas limitaciones mayores que otras (Mendoza de Gyves, 1994).

Con base a lo antes expuesto, la presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA), en la misma se aplicaron y se evaluaron por primera vez en El Salvador las Técnicas de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos de ‘Limón Pérsico’ (*Citrus latifolia* Bearss.), sobre patrones de “Mandarina Cleopatra” (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.), *Citrus volkameriana*, Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), esto como una alternativa para innovar y producir frutales de alta calidad fitosanitaria y demostrar a mediano y largo plazo los beneficios que la Biotecnología ofrece a todo el agro salvadoreño.

5 Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.

6 Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Históricos de Los Cítricos

Las formas primitivas de las plantas que actualmente se conocen con el nombre de cítricos o agrios, se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora, han sufrido numerosas modificaciones como consecuencia de las frecuentes mutaciones que experimentan espontáneamente, de las hibridaciones esporádicas que sin duda se produjeron, y de la selección natural, que permitió la desaparición, modificación o supervivencia de muchas de ellas (Durán-Vila & Moreno, 2000).

La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen, fue obra de grandes movimientos migratorios, como, las conquistas de Alejandro Magno, la expansión del Islam, las cruzadas, el descubrimiento de América y otros acontecimientos y circunstancias. Poco a poco llegaron a lugares alejados, estableciéndose y desarrollándose en aquellos en los que se podían aclimatar. En la actualidad, es el hombre, quien basándose fundamentalmente en criterios económicos, selecciona y difunde las especies y variedades más importantes (Amorós, 1999).

En la actualidad la producción mundial de todos los cítricos viene a ser del orden de los ochenta y cinco millones de toneladas, estando entre los mayores productores Argentina, Australia, Brasil, China, Cuba, Egipto, España, Estados Unidos, India, Israel, Italia, Japón, Marruecos, México, Turquía y Sudáfrica (Timmer *et al.*, 2002).

1.2 Hábitat de Los Cítricos

Los cítricos son árboles de hoja perenne que se adaptan a diversas situaciones ecológicas y se han difundido en muchas zonas del mundo comprendidas entre el Ecuador y las latitudes ligeramente superiores a los 40° N y S. No todas las variedades comerciales se cultivan en todos los climas, pues sus características pueden variar enormemente, pero existen las suficientes como para poder cultivarse económicamente entre los paralelos citados, además necesitan suelos permeables, humedad tanto en el suelo como en la atmósfera y unas temperaturas cálidas y suaves (Durán-Vila & Moreno, 2000).

Los cítricos han alcanzado su máximo desarrollo en las áreas subtropicales (30 - 40° latitud N y S). En estas áreas la producción es estacional y la calidad del fruto para el consumo en fresco es excelente. En las regiones subtropicales (desde Ecuador hasta 23 - 24° latitud N y S) la calidad del fruto es muy variable, dependiendo de los microclimas y de la altitud. En las áreas semitropicales, (23 - 24° latitud N. y S). los frutos tienen características intermedias (Durán-Vila & Moreno, 2000).

1.3 Floración de Los Cítricos

(Tucker *et al.*, 1995) aprecia que la formación de flores en los cítricos se debe a un proceso de desarrollo unitario, diferenciando dos fases: diferenciación de meristemas y desarrollo de la flor. Este proceso es continuo y acaba con la apertura de flores o antesis.

Según Amorós (1999), en este proceso de los cítricos, la interrelación de ciertos factores influye en gran parte sobre el comportamiento de la floración y el posterior cuajado de frutos, éstas son:

- Factores Biológicos (genéticos) de las diferentes especies y variedades de los cítricos cultivados.
- Factores climáticos concernientes a su ubicación.
- Factores relativos a las prácticas culturales.

1.4 Los Cítricos y su Fruto

La importancia comercial de los frutos cítricos se ha originado a partir de especies procedentes del sureste asiático. Hoy, los cítricos se extienden por todo el mundo, siempre que dispongan de suficiente pluviometría o posibilidades de riego para cubrir las necesidades de los árboles y siempre que el frío, si se produce, no sea tan intenso que pueda producirles la muerte (Timmer *et al.*, 2002).

1.5 Nomenclatura Botánica

Los cítricos pertenecen a la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioideae*; la mayoría de los árboles y patrones cultivados pertenecen al género *Citrus*, excepto los “kumquats”, englobados en el género *Fortunella* spp., y el “naranja trifoliado”, *Poncirus trifoliata*, sólo empleado como patrón. Los frutos se clasifican en diversos tipos: “naranjas”, dulces y amargas”, “mandarinas” y sus híbridos, “pummelos”, “pomelos”, “limones” y “limas” (Zaragoza, 1993; Knapp, 1999).

1.6 Morfología de Los Cítricos

1.6.1 Forma de los Arbustos

La forma del tronco y la copa de los cítricos está determinada por muchos factores, incluyendo la tendencia natural de la variedad, el patrón, la separación entre árboles, su edad, la poda y el tipo de injerto (Timmer *et al.*, 2002).

En climas secos, los arbustos tienen entrenudos más cortos, hojas más pequeñas y gruesas y una copa más compacta que en climas húmedos, los brotes pueden emerger en distintos flujos o formarse irregularmente durante el resto de la estación de crecimiento, normalmente con grandes variaciones entre los árboles e incluso entre ramas diferentes de un mismo arbusto, tanto en la duración como en el número de flujos. En climas subtropicales fríos, son típicos tres flujos principales; en climas subtropicales cálidos, son más corrientes cuatro a cinco flujos. En los trópicos, los flujos dependen de las precipitaciones y el crecimiento aparece al final de cada período seco. Con altos niveles de precipitación, los flujos son pequeños pero continuos. Los árboles jóvenes tienden a producir nuevas brotaciones de un modo más continuo que los de mayor edad y por ello son más propensos a las alteraciones o enfermedades que inciden solamente sobre las hojas y los tejidos jóvenes (Timmer & Duncan, 1999).

1.6.2 Hojas

La vida de las hojas de los cítricos varía mucho, en función del clima y del vigor conjunto del árbol. En muchas áreas, las hojas pueden permanecer en el árbol más de dos años antes de su caída, mientras que en otras regiones, y en particular cuando el crecimiento es rápido, incluso hojas sanas pueden caer durante su segundo año, cayendo a veces hojas jóvenes a menos de doce meses.

En muchas especies del género *Citrus*, los pecíolos son alados existiendo dos zonas de abscisión en las hojas: la base del pecíolo y la unión del limbo con el pecíolo; normalmente, la abscisión tiene lugar por la base del pecíolo. La separación por la base del limbo foliar, permaneciendo temporalmente el pecíolo unido al brote, suele ser un síntoma de estrés, causado por enfermedades o factores abióticos, como estrés hídrico o daños por heladas (Castle *et al.*, 1993).

La epidermis superior tiene una cutícula relativamente gruesa, con ausencia de estomas o presentes sólo en los nervios central y mayores. La empalizada del mesófilo (estratos celulares superiores) consta de apretados paquetes de células dispuestas en dos filas y contiene idioblastos cristalinos intercalados con oxalato cálcico (Morín, 1985).

El mesófilo esponjoso (estratos celulares inferiores) tiene ocho células grandes y amplios espacios con aire. La epidermis inferior lleva numerosos estomas; la cutícula sobrepasa los estomas y forma una cámara estomática exterior, en la que eventualmente pueden formarse núcleos resinosos. Debajo de las células epidérmicas, se localizan glándulas de aceite, más numerosas en las proximidades del haz de la hoja (Saunt, 1990).

1.6.3 Brotes

Cuando jóvenes, son de sección triangular, redondeándose tras los diferentes crecimientos secundarios. En los nudos, pueden desarrollarse espinas de diferente longitud. Los brotes jóvenes tienen estomas y glándulas de aceite. Los crecimientos secundarios se añaden al peridermo, que puede sustituir a la epidermis. Cuando los tejidos de un brote degeneran al ser invadidos por un patógeno o algún producto fitotóxico, suelen exudar gotas de goma en la madera muerta (Timmer *et al.*, 2002).

1.6.4 Raíces

La raíz primaria originada de la germinación de la semilla crece recta con detenimiento y, si no encuentra dificultades, se constituye en raíz principal, a la vez que se forman raíces laterales. Ambos tipos de raíz se ramifican, formando eventualmente un sistema radicular fibroso. El crecimiento de las raíces se realiza en flujos, que alternan con los flujos de los brotes y con el crecimiento cambial. El ápice de la raíz está ligeramente coloreado solamente durante el periodo de alargamiento activo, mientras que en los periodos de latencia de la raíz el ápice está suberificado. Las raíces de cítricos carecen de glándulas de aceite y normalmente forman una cabellera radicular escasa. Las raíces de muchos cítricos utilizan con rapidez el almidón y otras reservas si se produce algún debilitamiento en el tronco o la copa (Saunt, 1990).

1.6.5 Flores y Frutos

Los cítricos producen abundantes flores con cinco pétalos y numerosos estambres. Los pétalos son normalmente blancos, pero en algunas especies, como “limoneros” y “cidros”, pueden contener algunos pigmentos de antocianina. Sólo un pequeño porcentaje de las flores (normalmente menos del 5%) llega realmente a transformarse en fruto que permanece hasta la recolección (Timmer *et al.*, 2002).

El fruto de los cítricos es un tipo especial de baya denominado “Hasperidio”, que consiste en una epidermis y una pulpa carnosa con diez segmentos característicos (carpelos), unidos alrededor de su eje central. La corteza o epidermis comprende dos partes: una exterior, coloreada o “Flavedo” y una interior, blanca y esponjosa denominada “Albedo”. El “Flavedo” está cubierto de cera y lleva numerosas células de aceite. Los estomas quedan relegados a la parte de corteza situada entre las glándulas de aceite; contiene

clorofila y algunos carotenoides, con predominio de la primera en los frutos jóvenes, enmascarando a los demás pigmentos (Morín, 1985).

En la corteza de frutos jóvenes, daños ligeros debidos a efectos mecánicos, plagas o alguna enfermedad fúngica, estimulan la formación de lesiones peridérmicas en la corteza, que normalmente pueden llevar al fruto hasta la madurez (Timmer *et al.*, 2002).

La parte basal del fruto, zona peduncular, contiene el “botón” formado por el cáliz y parte del receptáculo floral, que permanecen en el fruto; en la madurez se forma la capa de abscisión, mientras que el botón queda adherido al fruto. Existe otra zona de abscisión en la base del pedúnculo, y cuando las flores o el fruto joven se caen, la abscisión aparece en esa zona (Castle *et al.*, 1993).

1.7 Propagación de Los Cítricos

Al igual que muchas otras especies cultivadas, los cítricos fueron propagados inicialmente por semilla, es decir, a través de plantas francas; pero a diferencia de la mayoría de los frutales, en los cuales las semillas monoembriónicas dan origen a un embrión sexual que manifiesta variabilidad de caracteres con relación a los de sus progenitores, en plantas nucelares, una menor variabilidad en las nuevas generaciones. Al mismo tiempo, la posibilidad de hibridación entre especies y aún entre géneros, dio motivo a la aparición de nuevos cultivares o variedades hortícolas, algunas de las cuales se perdieron, y otras por propagación vegetativa dieron origen a clones de importancia comercial (Morín, 1985).

La parte inicial de propagación de los cítricos por vía sexual fue posteriormente reemplazada por la vegetativa o asexual. Dentro de esta última la práctica del injerto se constituyó en el método de propagación más empleado (Campbell & Wheeler, 1962).

Mediante la propagación vegetativa, se consigue mantener en las nuevas generaciones las características seleccionadas en las plantas madres, lo que aparentemente, también sucede con las plantas nucleares. Estudios realizados permiten apreciar que, en términos generales las plantas nucleares tienden a presentarse como más espinosas, vigorosas y lentas en entrar en producción que las similares propagadas por injerto (Reuther, 1973).

La propagación vegetativa presenta algunas desventajas, entre las cuales se mencionan: mayor trabajo en la producción de las nuevas plantas; su longevidad es aparentemente menor que la de las plantas francas y muchas veces son menos robustas (Reuther, 1973).

Según Kadman & Slor (1974), al emplear la técnica de propagación por injerto se enfrentan algunas desventajas, al respecto, varios especialistas coinciden en el hecho de que en este tipo de propagación el problema debe atribuirse no al injerto propiamente dicho, sino más bien a una deficiente selección del patrón, el cual puede ser poco vigoroso, mal adaptado, o presentar deficiente compatibilidad.

1.8 Poliembrionía en la Propagación Comercial de los Cítricos

Es una característica hortícola muy importante en la producción comercial de árboles, especialmente de cítricos, en los cuales un gran número de especies producen semillas poliembriónicas, en un grado muy variado. La semilla puede presentar un embrión procedente de un óvulo fertilizado y uno o

varios embriones formados a partir de tejido nuclear. Esta semilla puede producir más de una plántula. Se cree que la poliembrionía es un carácter recesivo controlado por una serie de múltiples genes. En variedades poliembriónicas, la inducción de los embriones parece depender del estímulo de la polinización pero quizá no invariablemente necesaria. El número de embriones por semilla varía considerablemente, incluso de un árbol a otro y es influenciado significativamente por el estado nutricional y fisiológico del árbol, incluso semillas poliembriónicas y monoembriónicas pueden ocurrir en el mismo fruto y hasta en el mismo lóculo (OIRSA, 2000).

En los cítricos el embrión normal, procede de la ovocélula fecundada, además es muy frecuente que las células de la nucela (con 18 cromosomas propios de la planta madre) actúen directamente como si se tratara de ovocélulas, pasando a ser embriones sin que medie un proceso sexual previo. Estos embriones, denominados nucelares por su procedencia, ya que se han obtenido vía asexual, es decir, no ha intervenido en su formación ningún gametofito masculino que les haya transmitido genes (Amorós, 1999).

Consecuentemente, de las diversas plantitas o seedlings que nacerán de la misma semilla (tantas como embriones), solo una de ellas será de origen sexual y el resto serán idénticas a la planta madre (Amorós, 1999).

Según Amorós (1999), teóricamente se encuentran los siguientes tipos de semillas:

- a) Semillas con un embrión zigótico y otro o varios nucleares (caso corriente). El número de estos embriones nucleares oscila entre 1 y 20, aunque a veces más.
- b) Por aborto de embrión zigótico pueden encontrarse:
 - b.1) Semilla con embriones nucleares solamente, sin embrión zigótico.
 - b.2) Semillas que normalmente contienen un único embrión nuclear, siendo las demás poliembrionarias y, por consiguiente, nucleares.
- c) Semillas con presencia dominante de embriones nucleares, mostrando las demás uno zigótico y otro más de naturaleza nuclear.
- d) Semillas con un solo embrión zigótico, jamás nuclear.

1.9 Semillas, Agua y Solutos

Las semillas maduras usualmente cuentan con un contenido menor a 20% de agua, sin embargo, algunas no toleran el estado de desecación que esto representa. La mayoría presentan tolerancia a la desecación hasta un 4%, dependiendo de la humedad del ambiente en que se encuentren (Morín, 1985).

La pérdida de viabilidad ha sido atribuida a la desnaturalización de proteínas, pero las semillas viejas también pierden viabilidad debido a las mutaciones que en ellas ocurren (Brinks, 2000).

1.10 Dormancia de Las Semillas

La dormancia, es la habilidad de las semillas para retener la viabilidad mediante la restricción de las actividades metabólicas, durante este proceso no se observa crecimiento y hay un breve letargo en semillas y yemas. Ocurre en el momento en que los factores ambientales (*in vitro* o *ex vitro*) son suficientes y adecuados para desarrollar patrones en las mejores condiciones, además permite el posterior establecimiento de estos, en donde pueden contar con todas las sustancias de reserva y reguladores de crecimiento natural para alimentarse hasta ser agotados. Fisiológicamente la semilla esta provista de un suministro adecuado de agua, suficiente oxígeno para un metabolismo anaerobio normal, y un límite de tolerancia a la temperatura, incluye límites fisiológicos listos para ser franqueados al momento de superar la dormancia y reducir la tensión generada por el oxígeno o por el estrés hídrico (Bajwa *et al.*, 1977).

1.11 Patrones de Crecimiento en Yemas

Se ha comprobado que en las plantas existe un grado de control correlativo, el cual comprende un crecimiento secuencial entre hojas, entrenudos y yemas laterales. Estos patrones de crecimiento evidencian un sistema biológico en donde hojas y entrenudos atraviesan rápidamente cada una de las fases de crecimiento celular (Frison & Taher, 1991).

1.12 Nutrición y Control Ambiental en el Crecimiento de Yemas

Las diferentes posiciones morfológicas de las yemas, dentro del cuerpo de la planta responden de diversas formas a los cambios que experimentan los factores ambientales. Este fenómeno predispone a las yemas, mediante un control que implica complejos ultraestructurales y cambios bioquímicos y fisiológicos (Frison & Taher, 1991).

Agua, nutrientes inorgánicos y luz, son indispensables en el crecimiento autotrópico de las plantas. Estos factores determinan el mecanismo de crecimiento referido específicamente a yemas laterales, mediante modificaciones en la efectividad que cada uno de ellos arroja sobre el cuerpo de la planta, aparejados a los diversos procesos químicos en el desarrollo celular y diferenciación del tejido vegetal (Bidwell, 1979).

Los nutrientes juegan un rol fundamental en la inhibición correlativa de yemas, posiblemente vía hormonal y transporte de metabolitos, en cuyo caso no responden a estímulos o señales de crecimiento correlativo. En este sentido la dominancia apical en yemas, reside en el control de agua y la distribución de los nutrientes (Wilkins, 1984).

1.13 Reguladores de Crecimiento Vegetal en Cítricos

1.13.1 Auxinas

Según Amorós (1999), en las variedades que no tienen semillas, las auxinas se encuentran en mayor proporción que en las que producen semillas. En citricultura su uso es variado, ya que se emplean para:

- a) Aumentar el tamaño de los frutos. Bien produciendo un aclareo químico y estimulando su crecimiento.
- b) En la corrección de la vecería o alternancia. Aclarando frutos.
- c) Anticipación de la maduración.
- d) Retraso de la abscisión.

1.13.2 Citoquininas

No se tiene noticias de la detección de citoquininas en tejidos de cítricos, pero es de suponer que existen aplicaciones en el caso de cultivos asépticos. En California Murashige & Tucker (1969), han demostrado que la presencia de Kinetina, si bien no es indispensable, es necesaria para el crecimiento óptimo de tejidos de "limonero real" y hasta cierto punto de tejidos de "toronja", "citrón", "shadddock" y "naranja dulce", a pesar de que estos últimos no crecen muy bien cuando están bajo este sistema de cultivo continuo, con transferencias cada cierto tiempo.

1.13.3 Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de reguladores de crecimiento, formadas de diterpenos, los cuales están compuestos por cuatro unidades de isopropeno, por lo común formando tres anillos, además de presentar un puente de lactona. En la naturaleza existen muchas giberelinas, a las que se les designa como giberelina GA1, GA2, GA3 y así sucesivamente llegando más allá del GA40. La primera giberelina purificada y estructuralmente identificada fue el Ácido Giberélico (GA3), posteriormente se han aislado todas las demás, tanto de plantas superiores como de hongos, estando más ampliamente difundidas en la naturaleza GA11, GA3 y GA4 (Barba-Álvarez, 1987).

Ciertos experimentos indican que la cantidad de GA presente en la planta es mucho mayor en la proximidad del ápice del tallo, lo que señala que las giberelinas son suministradas principalmente por el ápice, más que por cualquier otra estructura (hojas jóvenes, embriones, etc). Las giberelinas son transportadas rápidamente dentro de la planta; éste transporte parece no ser direccional, pues se mueve con la misma facilidad tanto en dirección acrópeta como basípeta. Ésta translocación es llevada a cabo tanto en floema como en

xilema, puesto que se han encontrado giberelinas trasladándose a una velocidad de 50 mm/h en la savia floemática y xilemática (Devlin, 1980).

Las giberelinas presentan un espectro de actividad biológica muy variado en el crecimiento, pues pueden producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos, fenómeno que puede atribuirse a la estimulación de la división y al alargamiento celular; además tienen muchos efectos regulatorios en el desarrollo vegetal, debido a que son las responsables de la hidrólisis de las reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de las semillas; asimismo la expresión sexual de las flores también está asociada al control de las giberelinas, pues con un tratamiento de GA generalmente se inducen flores masculinas. La maduración de los frutos, la senescencia y dominancia de las yemas pueden ser alteradas por la aplicación de giberelinas que también actúan en la formación de frutos partenocárpicos, solas o en combinación con las auxinas (Bidwell, 1979).

Numerosos estudios han determinado que la influencia inhibidora sobre el crecimiento vegetal en general puede ser contrarrestada con la aplicación de Ácido Giberélico (Leopold & Kriedemann, 1975).

En cítricos se ha podido encontrar la presencia de giberelinas en diversas ocasiones; en Israel, Goldschmidt y Monselise (1968), encontraron que las ramas de algunas especies contenían giberelinas. En Japón, Kawarada & Sumiki (1959), encontraron giberelina A1 en brotes de "mandarino Satsuma" (*Citrus nobilis* L.), mientras que Khalifa *et al.* (1963), en California, encontraron giberelinas A1 y A9 en frutos de "Limonero real" (*Citrus limonium* L.) y "Naranja dulce" (*Citrus sinensis* L.), también Wiltbank y Krezdorn (1969), hicieron determinaciones de giberelinas en ovarios y frutos tiernos de "Naranja Washington Navel" (*Citrus* spp.), encontrando una correlación positiva entre la concentración de giberelinas

y la velocidad de crecimiento del fruto y entre la cantidad total de giberelina por fruto y el crecimiento acumulativo del mismo.

Se han encontrado además, algunas aplicaciones comerciales a las giberelinas en la citricultura moderna, en especial al Ácido Giberélico (AG3) y su sal potásica (Erickson & Bitters, 1953).

1.13.4 Ácido Abcísico

Este ácido fue encontrado en tejidos de cítricos, sus efectos son considerados más inhibidores que promotores, es aceptado en la actualidad en forma universal como una hormona vegetal (Cornforth *et al.*, 1966).

En 1970, Jones y Mansfield sugirieron que este producto era al menos parcialmente responsable del alto contenido inhibitorio observado en ramas de cítricos. Por su parte Goldschmidt & Monselise (1968), encontraron compuestos antigiberélicos en ramas de cítricos, a los que caracterizaron como “posiblemente idénticos” al ácido abcísico.

En cítricos se ha encontrado y considerado como parcialmente responsable del alto contenido inhibitorio de los brotes, aunque en este género la dormancia no es igual a la de plantas caducifolias, y es tomada más bien como la cesación temporal del crecimiento y desarrollo visibles (Jones & Mansfield, 1970).

1.13.5 Etileno

Es el compuesto orgánico más simple que afecta a las plantas, produciendo sus efectos a concentraciones sumamente pequeñas. Se sabe que es producido, difundido y acumulado en tejidos vegetales, de modo que las células que producen este compuesto pueden influenciar el comportamiento

fisiológico de células y tejidos adyacentes. Entre los roles hormonales que se le atribuyen están: (1) aumentar la respiración y acelerar la decoloración en frutos de muchas especies, (2) inhibir el crecimiento radical y (3) favorecer la abscisión de hojas, flores y frutos (Beyer *et al.*, 1984).

1.13.6 Otros Componentes

El dióxido de carbono (CO₂) en grandes concentraciones está presente en el cultivo de varias especies, asociado generalmente con el etileno. Estas altas concentraciones tienen efecto sobre la respiración, la fotosíntesis y por lo tanto en el crecimiento del tejido vegetal. En cultivo de meristemos, la proliferación de brotes es promovida por la presencia de CO₂, posiblemente por su acción en la fotosíntesis; sin embargo, en callos heterotróficos y cultivos celulares, las altas concentraciones de CO₂ a menudo inhiben la proliferación de brotes y no tienen efecto alguno sobre el crecimiento, tal como se evidenció en experimentos con *Daucus* y *Catharantes* (Adkins, 1992).

1.14 Cultivo de “Limón Pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) en El Salvador.

Según el MAG (2000), el cultivo de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) es de gran importancia en El Salvador, dado que constituye una alternativa de diversificación agrícola por su demanda en los mercados internacionales, así como por ser una especie de fácil adaptación, ya que se puede plantar en un amplio rango de tipos de suelo y de alturas, desde el nivel del mar, hasta los 1000 m.s.n.m, prácticamente en la mayor parte del territorio nacional (Apéndice 1).

1.15 Situación Actual del Cultivo de “Limón Pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) en El Salvador

A pesar de su facilidad para propagarse, hasta 1999 no existe un registro exacto de la superficie cultivada de limón en el país (VIFINEX, 2000). Sin embargo, se estima una superficie plantada de “limón pérsico” de 500 manzanas las cuales se encuentran ubicadas en diferentes localidades principalmente costeras como Santiago Nonualco, San Luis Talpa y otras; así como Zapotitán, Chalchuapa y Metapán (MAG, 2000).

1.16 Descripción Botánica de “Limón Pérsico”

“Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) pertenece a la familia *Rutaceae*, el fruto tiene forma oval con un diámetro ecuatorial que oscila entre 50 y 70 milímetros, la pulpa es verde-amarilla, con ausencia de semillas, la cáscara presenta una coloración verde desde tonalidades intensas hasta clara (OIRSA, 2000).

Este arbusto es de porte aparrado con ramas inferiores que tienden a posarse sobre la tierra. Alcanza una altura de 6 a 7 metros y un diámetro de 5 a 6 metros, el tronco es corto y sus ramas crecen en varias direcciones. Los frutos sin semilla son normalmente más grandes que los del “limón nacional” (*Citrus limonium* L), cuando están maduros tienen un color amarillo y son blandos al tacto (VIFINEX, 2000).

1.17 Clasificación Taxonómica de “Limón Pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.)

Según Batsford (1993), y Mabberley (1997), la clasificación taxonómica de “limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.), es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Dicotyledoneae

Sub-Clase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Subfamilia: Aurantioideae

Género: *Citrus*

Especie: *latifolia*

Nombre Científico: *Citrus latifolia* Bearss.

1.18 Principales Enfermedades Virales Presentes en “Limón Pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) en El Salvador

1.18.1 Tristeza de los Cítricos

Esta enfermedad es causada por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC), que ataca dependiendo de la raza y susceptibilidad de la planta infectada, ocasiona bloqueo de los vasos conductores, impidiendo de ésta manera el paso de la savia a la raíz, las cuales mueren por desnutrición. Este virus se puede transmitir de dos maneras, ya sea por injerto al utilizar yemas infectadas, o a través de vectores (insectos), entre los cuales se encuentran

algunos áfidos, como *Toxoptera citricida*, que es el vector más eficiente para la rápida diseminación de la enfermedad (Skaria *et al.*, 1993).

Los factores determinantes para la aparición de la enfermedad son: existencia de plantas infectadas con el virus, presencia de árboles injertados sobre patrones susceptibles como “naranja agria” (*Citrus amara* L.). En plantas afectadas, las hojas son de aspecto coriáceo, enrolladas hacia el nervio central, de tamaño inferior al normal, pierden su brillo y presentan un color verde plumizo (Skaria *et al.*, 1993).

Los brotes son cortos y débiles, la floración es excesiva, fuera de época y las plantas se desfolian. La fructificación es abundante pero los frutos no llegan a desarrollarse ni a madurar normalmente, pierden su brillo característico y presentan un color verde plumizo (Skaria *et al.*, 1997).

1.18.2 Psorosis

Esta enfermedad es causada por el Virus *Citriovir psorosis* (VCP), produce daños considerables muchas veces progresivos a través de un número variable de síntomas, en prácticamente todas las combinaciones de patrones, especies y variedades comerciales. Este problema se considera como una enfermedad de avance lento, la cual se puede manifestar en plantaciones de siete a veinte años de edad, las diferentes formas del patógeno son destructivas y causan el debilitamiento de árboles afectados e influyen en la longevidad de la huerta y en la producción. La distribución de la enfermedad se ha reportado como un desorden común, y se encuentra en huertos del centro y occidente. La transmisión se efectúa muy comúnmente por medio de injerto, entre ellos el injerto de raíces entre una planta sana y una enferma. En el caso de la “variegación infecciosa” ha sido posible transmitirla mecánicamente utilizando savia de plantas enfermas. Hasta el momento, no ha sido posible encontrar

algún insecto vector de la enfermedad. Con respecto a los patrones tolerantes a esta enfermedad existen contradicciones (Pratt, 1958).

1.18.3 Exocortis

La Exocortis es ocasionada por un patógeno conocido como Viroide Exocortis de los Cítricos (CEV), el cual es una molécula de ácido ribonucléico. Los síntomas característicos de la enfermedad comprenden agrietamientos y descamamiento que van de leves a severos en el tallo correspondiente al patrón, asimismo el grosor del tallo y vigor de la planta es reducido notoriamente (Bitters *et al.*, 1972).

Es una enfermedad que afecta variedades comerciales de cítricos injertados en patrones susceptibles tales como *Poncirus trifoliata*, los “citramges” (*Citrus jambhiri* Lush) y la “lima ácida Rangpur” (*Citrus limonia* Osb.). El virus puede estar presente en los huertos sin que las plantas muestren síntomas aparentes siempre, que los patrones utilizados no sean susceptibles. Muchas clases de cítricos como “naranja dulce” (*Citrus sinensis* L.) y algunas “mandarinas” (*Citrus nobilis* L.), pueden ser enanizadas ligeramente por la enfermedad aún cuando no desarrollen los síntomas típicos (Whiteside *et al.*, 1988).

1.18.4 Xiloporosis

El agente causal de ésta enfermedad es el virus *Xiloporosis* de los cítricos “Reichert” y “Perbege”. Éste virus solo se transmite por injerto. Los síntomas primarios consisten en huecos en forma de canales o picaduras en la madera en los que se acomodan las combas o crestas de la corteza del portainjerto, éstos aparecen en el lapso de los 18 meses a los 4 años; después de la colocación de la yema. En el segundo estadio de la enfermedad, la corteza está más deprimida y

estas depresiones se unen y forman parches o bandas. Por lo general hay un sobrecrecimiento del injerto en la unión con el pie debido a la acumulación de hidratos de carbono. Se produce un enanismo y franco desmejoramiento de la planta. Ésta enfermedad afecta a varias especies de cítricos, algunas de las cuales son empleadas como portainjertos y otras como productoras de frutas comerciales (Morín, 1985).

Según Buchner & Ramírez (1994), el declinamiento ocurre cuando el patrón es susceptible, como en el caso de "lima dulce" (*Citrus limetoides* L.) y algunas variedades de "mandarinas" (*Citrus nobilis* L.).

1.19 Aplicación de Biotécnicas en la Propagación y Mejoramiento de los Cítricos

El surgimiento de la Biotecnología Vegetal y su contribución y aplicación a cultivos nuevos, incluso para poder prescindir de la planta en su conjunto, ha traído como consecuencia los avances de la técnica de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales y de la Biología Molecular. En 1902, el alemán Haberlandt, estableció el primer concepto de la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales, afirmando que los resultados de cultivar células vegetales aisladas de plantas superiores en soluciones nutritivas simples, conducían a una importante visión del conjunto de propiedades y potencialidades que presenta la célula como organismo elemental, además de proporcionar información acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células de un organismo multicelular completo (Lindsey & Jones, 1992).

La aplicación de Biotécnicas en la agricultura, se puede enmarcar en el mejoramiento de la calidad de las plantas, mediante el enriquecimiento de sus condiciones nutritivas, forma, color, textura entre otros (Kuan & Ospina, 1990; Peters, 1993), lo mismo que en el desarrollo de la capacidad genética de las

plantas para conferirles resistencia a plagas y enfermedades; así también, en el desarrollo de plantas en condiciones adversas de la naturaleza (Mendoza de Gyves, 1994).

Estas técnicas, deben permitir al explante sortear frecuentes dificultades como la oxidación, heterogeneidad de respuestas, reversión al estado juvenil, presencia de inhibidores de enraizamiento y sobre todo, la sobrevivencia al trasplante en condiciones autótrofas (Roca & Mroginski, 1991). Considerables progresos se han logrado en los últimos años en la manipulación de la técnica de cultivo de tejidos, lo cual ha permitido regenerar un gran número de especies de plantas a partir de órganos, tejidos, células y protoplastos aislados.

Los cítricos son el grupo de plantas cultivadas, donde las técnicas de cultivo de tejidos, meristemos, óvulos, embriones, anteras y protoplastos, han sido aplicadas ampliamente logrando importantes progresos en su uso. Especialmente en la recuperación de clones libres de patógenos, de origen viral principalmente (Morín, 1985).

1.19.1 Cultivo de Tejidos en el Mejoramiento de los Cítricos

Desde el punto de vista del mejoramiento del estado de las plantas y del mejoramiento genético, el cultivo de tejidos ha hecho una contribución importante en la citricultura, que ha permitido que algunas técnicas como la microinjertación de ápices caulinares desarrollada por Navarro *et al.* en 1975, para que la limpieza de virus de clones seleccionados, se generalicen en todo el mundo. Han sido desarrolladas tecnologías que contribuyen a la obtención de plantas libres de patógenos, algunos con limitaciones mayores que otras.

1.19.2 Banco de Germoplasma

Morel (1975) y Henshaw (1975), abogaron por la función que podían tener las técnicas de cultivo *in vitro*, en la conservación de los recursos fitogenéticos, como alternativa al mantenimiento de colecciones para uso inmediato en el mejoramiento de plantas.

También en este período se realizó un trabajo exitoso en la conservación de tejidos vegetales por crioconservación en la Universidad de Nottingham (Street, 1973), sólo en 1980 se reconoció el potencial de los métodos de cultivo *in vitro* para la conservación de especies difíciles de propagar (Withers & Williams, 1985); éste término se refería a especies propagadas vegetativamente cuya semilla no era sensible a las condiciones corrientes de conservación de semillas, es decir, a la temperatura baja y al contenido de agua reducido, como ocurre en numerosos frutales tropicales perennes y en diversas palmas.

Basándose en un informe global de Whithers (1979) sobre conservación *in vitro*, la Junta Internacional para Recursos Fitogenéticos (IBPGR, por sus siglas en inglés), estableció a principios de la década del ochenta, un grupo científico de trabajo para que considerara todos los aspectos de la conservación *in vitro* de plantas; como resultado de ese trabajo, se tomaron decisiones relevantes para esta actividad científica (Whithers, 1980; Bajaj, 1977; IBPGR, 1983 y Schilder-Rentschler & Roca, 1987).

Desde el esfuerzo inicial de la década del setenta, se ha logrado un notorio progreso, a tal grado que en 1991, Villalobos *et al.* plantearon la posibilidad de desarrollar un mecanismo estable para la conservación de recursos fitogenéticos a partir del aislamiento de células, tejidos y órganos, propiciando el máximo aprovechamiento de las técnicas de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales.

1.19.3 Cultivo de Tejidos en la Propagación de Cítricos

Las investigaciones en cultivo de tejidos en cítricos, han sido orientadas hacia el cultivo de tejidos de órganos reproductivos: nucelas, óvulos fertilizados o no, ovarios, a través del cual se han hecho considerables avances en la obtención de plantas libres de virus y en el mejoramiento genético. No obstante, se han realizado importantes investigaciones en el cultivo de segmentos de tallos y raíces, con objeto de aplicarlos a la propagación asexual, así como una fuente de material en la microinjertación de ápices caulinares, como sistema seguro de movilización de materiales de una región o un país a otro, en el estudio de la potencialidad de organogénesis de los diferentes tejidos para su aplicación posterior en mutaciones somáticas o hibridaciones de protoplastos y para multiplicar plantas libres de virosis (Button & Kochba, 1977).

1.19.4 Medios de Cultivo

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, y calidad de reactivos, usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada; ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas (mezcla de sales), compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte (Merino, 1987).

Thosio Murashige & Folke Skoog (1962), al estudiar los requerimientos nutritivos en tejidos de tabaco, propusieron una fórmula que está caracterizada por la presencia de altas concentraciones de Amonio (NH_4) y Nitratos (NO_3), que permitían un crecimiento de cinco a siete veces mayor que con los medios utilizados anteriormente.

Ésta fórmula fue conocida más tarde como “MS”, y ha sido la base para la creación de medios de cultivos modificados (Gautheret, 1992).

El MS incluye macroelementos (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg) y microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) en concentraciones adecuadas. Varios de éstos tienen diferentes formas de ser asimilados por el tejido explante, dado que pueden surgir problemas de toxicidad para éste, debe controlarse la concentración de los elementos por ajustes de pH (Kuan & Ospina, 1990; Krikorian, 1991).

Los carbohidratos utilizados en los medios de cultivo como fuente de carbono para la célula vegetal son sacarosa, dextrosa (glucosa) y fructosa. En algunos casos, el uso de sorbitol y de manitol es para mantener la presión osmótica del medio. Las vitaminas son parte del complejo de nutrientes requeridos en el medio de cultivo y favorecen el crecimiento celular, entre ellas están: Tiamina (B1), Piridoxina (B6), Ácido Nicotínico (B3), Ácido Pantotéico complementado con Calcio (B5), Cobalamina (B12). Los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo son determinantes para el metabolismo de las células vegetales, ya que en poca cantidad pueden inducir, inhibir o cambiar la fisiología y morfología de las plantas (Dixon, 1987).

Monnier (1974), estudiando diversos factores observó que la fuente principal de carbohidratos era la sacarosa, cuyas concentraciones varían de acuerdo a la fisiología de la planta subcultivada, notó la supresión en el crecimiento de la raíz con el uso de la Kinetina, y la formación de embriones al usar giberelinas en los medios nutritivos.

1.19.5 Factores Físicos

En forma general se detalla la influencia de éstos factores sobre el cultivo de tejidos vegetales; el pH por ejemplo, es específico para cada tipo de planta, por lo que es necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio; sin embargo, éste puede oscilar en un rango de 4.5–7.0 para las plantas. Si la intensidad y calidad de la luz es muy baja, se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala, para tener diferentes longitudes de onda. Con respecto a la temperatura, ésta se puede fijar en función del tiempo, ya sea de acuerdo con los períodos de luz y oscuridad o por horas, usualmente la temperatura del cuarto de cultivo se mantiene alrededor de los 25°C. Algunas especies pueden requerir variaciones de acuerdo a su tratamiento para un mejor crecimiento (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

1.20 Organización del Meristemo Apical y Regeneración de Plántulas Obtenidas por Cultivo *in vitro*

En los primeros estadios del desarrollo embrionario vegetal, la división celular tiene lugar en todo el organismo, pero a medida que el embrión se desarrolla y se transforma en una planta adulta la adición de nuevas células se restringe a ciertas partes de la misma, mientras que el resto de la planta se especializa en otras actividades. Estos grupos de células que retienen su actividad embrionaria durante toda la vida de la planta se denominan MERISTEMOS. Estos se ubican en ápices de raíz, tallo (principales y laterales); en tallos y raíces hay meristemos intercalares. Los meristemos primarios permiten el crecimiento en longitud y los secundarios se encargan del crecimiento en grosor de tallos y raíces leñosas. El meristemo apical del tallo da lugar a diversos tipos de células, tejidos y órganos; esta región indiferenciada da origen al crecimiento de la planta (Esau, 1976).

En cuanto a la organización de los ápices meristemáticos, de acuerdo con la filotaxia, simetría bilateral, determinación de modelos vasculares en raíces y brotes, y la dominancia y autodeterminación del meristemo con respecto a control de desarrollo, Sussex (1963), describe una organización apical con cinco regiones que pueden ser comunes para ápices de todos los grupos de plantas, ésta consta de:

- a) Región distal (meristemática).
- b) Región subdistal (primordios foliares).
- c) Región inorgánica (tejidos internos).
- d) Región subapical (elongación de axis, diferenciación del tejido vascular y elongación de los entrenudos).
- e) Región de maduración (estabilización morfogenética).

De acuerdo a Mosella & Ascui (1983), la regeneración de plantas sanas partiendo del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de ciertos vegetales leñosos exige la búsqueda de técnicas complejas y su empleo acertado.

El éxito obtenido en la regeneración de plantas libres de virus a partir de los trabajos de Morel & Martin (1952) y que en la actualidad han producido comercialmente un centenar de especies herbáceas, no ha sido posible más que en contadas especies frutales y forestales (Mosella & Ascui, 1991).

1.21 Cultivo *in vitro* de Meristemos

Mediante la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se pueden estudiar diferentes fenómenos morfogénicos que ayuden a entender cuáles son los factores fundamentales que intervienen en la morfogénesis y diferenciación de partes aisladas de la planta, y que están fuera de las influencias correlativas del resto de la misma. Se pueden cultivar varios tipos de tejidos, como protoplastos, callos, nucelas, óvulos, primordios florales y meristemos apicales y laterales (Walkey, 1978).

De éstos tejidos, los meristemos apicales han sido los explantes más efectivos para la producción de plantas completas y sanas, en una amplia gama de cultivos económicamente importantes (Quak, 1977).

Si se cultivan en un medio adecuado, los meristemos pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes; las plantas regeneradas usualmente retienen las características genéticas de los progenitores, lo que se debe a la naturaleza diploide de las células meristemáticas (Murashige & Skoog, 1962).

El estudio detallado *in vitro* de los requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales ayuda a entender los mecanismos reguladores que controlan la diferenciación de las plantas. Aquí radica la gran importancia de los meristemos de la planta, pues se encuentran asociados con células altamente indiferenciadas; además, de que el meristemo da origen a diversos tipos de células, tejidos y órganos para formar una planta completa; también se perpetúa a sí mismo produciendo células que retienen su actividad meristemática (Hurtado & Merino, 1987).

1.22 Aplicaciones del Cultivo de Meristemos

La facilidad de usar la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la multiplicación masiva, permite producir material vegetal *in vitro* por la iniciación de brotes adventicios, bulbos, tubérculos, embriones asexuales o por crecimiento de brotes de yemas axilares y producción masiva de plántulas a partir de meristemos (Mullin & Schlegel, 1976).

Los propagadores comerciales, tienen estandarizado el método de mantenimiento de un lote comercial de material madre *in vitro*, en donde además, tienen la ventaja de mantenerlo en un espacio reducido con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables. Esto es debido al potencial morfogenético que tienen los meristemos y otros tejidos de la planta en la producción masiva de brotes. Existen muchos géneros vegetales que se propagan por cultivo de tejidos para la obtención de grandes cantidades de plantas de importancia comercial, como son *Anthurium andreanum*, *Dieffenbachia amoena* Snow, *D. Picta* Perfection, *Philodendrom oxycurdium*, *Scindapsus aureus*, *Syngonium podophyllum*, *Chrysanthemun morifolium*, *Gerbera jamesoni*, *Begonia* spp, *Dianthus caryophyllus*, *Pelargonium pelatum*, *Saintpaulia ionantha*, *Cattleya* spp, *Saxifraga sarmentosa* Tricolor, etc. (Hurtado & Merino, 1987).

1.23 Obtención de Plantas Libres de Virus

Las plantas cultivadas están expuestas a enfermedades que reducen su vigor, calidad y rendimiento. Los hongos y bacterias se pueden controlar con sustancias químicas o control biológico; no obstante con los virus no se ha tenido éxito y su transmisión se ve favorecida por la propagación asexual cuando el material original o planta madre se encuentra infectada. Con el fin de controlar los virus, se han ensayado diferentes métodos, entre ellos la

quimioterapia, la termoterapia y el cultivo de meristemas. Los virus causan pérdidas dramáticas en la cantidad y calidad de la cosecha. La producción de material vegetal indexado, libre de virus mediante la técnica de cultivo de meristemas constituye una solución parcial para los problemas causados por las enfermedades virales (Flores-Vindas, 1998).

1.23.1 Importancia de la Técnica de Termoterapia en la Eliminación de Virus

Partiendo de las investigaciones de Kartha *et al.* (1974), el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en 1982 implementó las técnicas de cultivo de puntas meristemáticas relacionadas con la termoterapia; con el objeto de eliminar los virus de las variedades de hortalizas infectadas.

Según Roca *et al.* (1991), el desarrollo de técnicas sensibles para el diagnóstico de los virus, ha contribuido enormemente en la producción masiva de plántulas en las que se ha probado la ausencia de organismos patógenos. La eliminación de los virus depende en alto grado, de la exposición de las estacas con brotes a una temperatura alta (40°C diurna y 35°C nocturna) durante 3 a 4 semanas antes de la escisión de las puntas meristemáticas.

La aplicación de termoterapia antes del cultivo de meristemas, condujo a la exclusión en un 100% de una serie de virus, aún cuando algunos de ellos infectaran a una planta. La temperatura hace que la división celular del meristemo sea más acelerada que la del virus, pues él es menos activo bajo éstas condiciones, permitiendo así la separación entre ellos (Fontúrbel, 2001).

1.23.2 Importancia de la Microinjertación *in vitro* de Ápices Meristemáticos en la Eliminación de Virus

El cultivo *in vitro* de ápices caulinares (meristemo apical con uno o dos primordios foliares), ha sido empleado para la obtención de plantas genéticamente más efectivas, así como para la producción en masa de plantas con la sanidad vegetal obtenida (Pereira da Paz & Pasqual, 1998).

Las principales aplicaciones del microinjerto son: obtención de plantas libres de virus, importación de plantas por procedimientos de cuarentena; separación de virus en infecciones mezcladas, y estudios sobre incompatibilidad en el injerto (Navarro, 1988).

Las investigaciones hechas por Torres *et al.* (1998), sostienen que hasta 1971 las especies de frutales presentaban dificultades de regeneración a partir de ápices caulinares; es por ello que se hizo necesario desarrollar un nuevo método al que llamaron “Microinjertación *in vitro*”, y que supusieron, serviría para contrarrestar ese problema.

Buscando una mejor respuesta del ápice meristemático de algunos cítricos, Murashige *et al.* (1972), y Navarro *et al.* (1975), plantearon la posibilidad del microinjerto *in vitro* de ápices meristemáticos sobre plántulas provenientes de semillas, logrando así el desarrollo de plantas libres de numerosos virus (Navarro & Juárez, 1977; Roistacher, 1977).

El microinjerto *in vitro* fue aplicado más tarde al “manzano” (Alskief, 1978; Jonard *et al.*, 1983), al “damasco” (Martínez *et al.*, 1979) y a las “vides” (Engelbrecht & Schwerdtfeger, 1979), en las que se obtuvieron ejemplares libres de virus.

Ha sido posible también en el curso de otras investigaciones, regenerar plantas a partir del cultivo directo del ápice *in vitro*, tanto de “duraznero” (Mosella *et al.*, 1979) como de “limonero” (Mosella & Ascui, 1983).

Yemas dormantes (inactivas), o cultivadas *in vitro*, también se han usado como puntas meristemáticas. En ambos casos, la incidencia de los injertos en cuanto a la eliminación de patógenos, se redujo comparada con las otras fuentes (Navarro *et al.*, 1976).

Con ésta innovación, se producen frutales de alta calidad fitosanitaria y con características adultas sujetas, a la no-reversión al estado juvenil, dado que consiste en microinjertar en condiciones asépticas un ápice caulinar, conteniendo dos o tres primordios foliares, excisado de una planta madre, sobre un portainjerto establecido y proveniente de semilla germinada *in vitro*, se decapita el portainjerto y se hace una escisión en forma de T invertida, en donde se introduce el microinjerto (Pereira da Paz & Pasqual, 1998).

Pereira da Paz & Pascual (1998), describen el proceso de “Microinjertación *in vitro*”, el cual consta de los siguientes pasos:

- a. Selección de material a microinjertar.
- b. Determinación del tamaño del material que se utilizará como micro y portainjerto.
- c. Decapitación del portainjerto y colocación del microinjerto.
- d. Germinación *in vitro* de la plántula microinjertada.
- e. Extracción de plántula microinjertada para su trasplante a maceta.

Ápices meristemáticos han sido usados con éxito para recuperar plantas libres de virus en por lo menos 28 especies de cítricos, muchos híbridos y varias especies parientes de cítricos.

Se han observado diferencias en el éxito de los microinjertos entre una especie y otra, pero no se han llevado a cabo estudios comparativos al respecto (Navarro *et al.*, 1988).

1.24 Importancia de los Patrones Utilizados como Portainjertos en Cítricos y Enfermedades a Prevenir con Énfasis en Virosis.

Para seleccionar un patrón o portainjerto de cítricos se toman en cuenta las variables de productividad, calidad de fruto, tolerancia a plagas y enfermedades, precocidad, madurez tardía o temprana y otras; pero también es importante conocer el comportamiento de los patrones durante las etapas de producción en vivero, con el fin de conocer en forma integral las bondades o los defectos de éstos (Buchner & Ramírez, 1994).

El patrón ejerce una influencia vital en la producción y comportamiento de los cítricos. Las ventajas que se obtienen con la utilización de un patrón adecuado son múltiples, entre ellas se pueden mencionar las siguientes: una mejor adaptabilidad a diferentes condiciones de suelo y clima; mayor uniformidad en calidad de fruto y época de producción; es posible obtener plantas más pequeñas y que producen más pronto que aquellas no injertadas; es factible la obtención de combinaciones resistentes o tolerantes a enfermedades fungosas, nemátodos o virales; finalmente ofrece la posibilidad de utilizar material de injertación certificado libre de virus (Batchelor & Bitters, 1952) .

(Buchner & Ramírez, 1994), detallan que en 1994, la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), elaboró una guía para la producción de cítricos, en donde establece que el patrón ejerce una influencia vital sobre la producción y el futuro comportamiento de la especie cítrica seleccionada. Éste proporciona en algunos casos una mejor adaptabilidad a diferentes tipos de suelos y clima, uniformidad en la calidad de fruto y época de producción; algunos producen plantas más pequeñas (patrones enanizantes) y producen antes que las no injertadas, influyen sobre la resistencia o susceptibilidad a enfermedades, nemátodos y virus.

1.24.1 Características Esenciales de un Buen Patrón

Amorós (1999), establece las características que debe reunir un buen patrón de cítricos, siendo éstas:

1. Una buena resistencia a la gomosis producida por la *Phytophthora*, principal enfermedad criptogámica que afecta a los tejidos conductores de savia de raíces y tronco.
2. Una asociación injerto/patrón tolerante a la enfermedad vírica de la Tristeza.
3. Una buena adaptación a suelos alcalinos y con contenidos elevados en sales) este tipo de suelos son frecuentes en las zonas mediterráneas).
4. Multiplicación y cultivo fáciles en vivero, ya que las plantas homogéneas ofrecen una buena afinidad con el injerto de las principales especies y variedades comerciales.

5. El efecto favorable del patrón sobre el injerto se traduce en una rápida entrada en producción, una productividad elevada y continua, y una buena calidad de los frutos, tanto por su calibre como por su riqueza de sumo.1.22.2

1.24.2 Citranges Troyer y Carrizo

Amorós (1999), sostiene que son híbridos de “naranja dulce” y “naranja trifoliado”, además cita a otros autores que los sitúan como híbridos de *Poncirus trifoliata* y *Citrus sinensis* (naranja Washington navel). Obtenido en Riverside (California) en 1909 por E.M. Savage, polinizando flores de Washington Navel (*Citrus sinensis* L.) Osbeck) con polen en *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Poseen ciertas cualidades y defectos heredados del *Poncirus trifoliata*, pero con alguna atenuación por el hecho de su hibridación con el género *Citrus*. Los *Citranges Troyer* y *Carrizo* tienen características muy próximas: el *Citrango Carrizo* fue seleccionado a partir de una semilla de Citrange Troyer.

Características:

1. Muy buena resistencia a la gomosis producida por *Phytophthora* (en California y en Marruecos se muestran más resistentes que el naranja amargo).
2. Buena tolerancia a la Gomosis, Psorosis y Tristeza, aunque en Estados Unidos se han señalado algunos casos de debilitamiento causado por la Tristeza en árboles injertados sobre citrange Troyer.

3. El crecimiento y vigor de los plantones en vivero son superiores a los del naranjo amargo, con una excelente homogeneidad debido a su elevado grado de Poliembrionía (prácticamente el 100% de las plantas son nucelares).
4. El injerto en vivero no presenta problemas, los injertos inician fácilmente el desarrollo más rápidamente que en el caso del naranjo amargo.
5. La compatibilidad con el injerto es mejor que si se le compara con la obtenida con el *Poncirus trifoliata* (efecto parental positivo transmitido por el *Citrus sinensis*); se ha observado muchas veces una incompatibilidad entre el limonero Eureka y el citrange Troyer.
6. Confieren a los injertos una buena resistencia al frío, pero sin duda ligeramente inferior a la que confiere el *Poncirus trifoliata*, ya que los Citranges no pierden las hojas en el invierno.
7. La productividad y la calidad de los frutos producidos por los árboles injertados sobre citranges se muestran superiores a las de los frutos procedentes de árboles injertados sobre naranjo amargo, y en ocasiones, igualmente superiores a las de los frutos de árboles injertados sobre *Poncirus trifoliata*.

Defectos:

1. Su sensibilidad a la Exocortis. Es conveniente, por tanto, tomar en el vivero las mismas precauciones recomendadas para el caso del *Poncirus trifoliata*, a saber: no injertar salvo que los injertos procedan de plantas indemnes a la Exocortis.

2. Su sensibilidad a la caliza activa del suelo y a los cloruros es ligeramente menos elevada que la del *Poncirus trifoliata*.
3. Son menos sensibles que el *Poncirus trifoliata* a los excesos de humedad en terrenos pesados.

1.24.3 Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.)

Según Amorós (1999), este también es un buen portainjertos que presenta buenas cualidades por su adaptación a los suelos mediterráneos.

Características:

1. Tolerancia a la Tristeza, Psorosis, Xiloporosis y Exocortis.
2. Sus frutos contienen numerosas semillas, altamente poliembriónicas, que permiten la obtención en el vivero de plantas homogéneas (alrededor del 90% de plantas nucelares).
3. Su afinidad de injerto es satisfactoria con la mayor parte de especies y variedades comerciales.
4. Buena tolerancia a contenidos elevados del suelo en caliza activa.
5. Resistencia a las sales, y en particular al cloruro sódico, superior a la del naranjo amargo.

Desventajas:

1. Su resistencia a la gomosis de la *Phytophthora* no es absoluta, se ha señalado numerosos casos de ataque a este patrón.
2. Su multiplicación en vivero puede crear algunos problemas; el crecimiento tras al trasplante de plantas procedentes de semillas es algunas veces difícil. El injerto es delicado en el caso de algunas variedades y su posterior desarrollo es más lento.

La producción y la calidad de los frutos producidos por las especies y variedades injertadas sobre “Mandarina Cleopatra” son, muchas veces, inferiores a las obtenidas con el naranjo amargo.

1.24.4 Swingle Citrumelo CBP 4475

Los *Citrumelos* son el resultado de la hibridación *Poncirus trifoliata* x Pomelo. *Citrumelo* CBP 4475 se obtuvo en 1907 por W.S. Swingle, en Eustis (Florida), polinizando flores de pomelo Duncan (*Citrus paradisi* Mcf.) con polen de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Amorós, 1999).

Otros dos híbridos parecen ser bastante prometedores: el primero, *Citrumelo* 1452 que confiere rendimientos elevados, con frutos de buen calibre y una relación E/A superior a la obtenida en los frutos de los mismos clones injertados sobre naranjo amargo. El segundo el *Citrumelo* Swingle, recientemente introducido por las estaciones Citrícolas Mediterráneas, es juzgado en California como un excelente patrón a pesar de que no se adapta bien a algunos tipos de suelos. Este *Citrumelo* es tolerante a la Exocortis y la Tristeza (Amorós, 1999).

1.24.5 *Citrus volkameriana* Pasquale

El *Citrus volkameriana* es utilizado en Sicilia y en Túnez por su resistencia a la enfermedad criptogámica que afecta al limonero, conocida con el nombre de “mal seco”. Sin embargo, después de algunos años, esa resistencia parece ser menos notable. En la actualidad es tolerante a la Tristeza, Psorosis, Exocortis y Xiloporosis (Amorós, 1999).

1.25 Enraizamiento *in vitro* de Brotes de Portainjertos de Cítricos

La capacidad de los tejidos vegetales *in vitro* para la formación de raíces, depende de varios factores endógenos y exógenos y sus interacciones (Alskief, 1978).

La obtención de una plántula con un sistema radicular bien desarrollado es de gran importancia para la sobrevivencia y crecimiento en nuevas condiciones ambientales, sostienen además que las plántulas deben contar con un sistema vascular bien desarrollado, buena relación entre sistemas vasculares de raíces, brotes y hojas, así como una buena relación raíz-brote (Bajwa et al., 1977).

El papel de las auxinas en la inducción y desarrollo de raíces ha sido bastante estudiado, siendo principalmente utilizados, el Ácido Indolbutírico (AIB), Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Indolacético (AIA) (Bajwa et al., 1977).

Barba-Álvarez (1987), sostiene que la aplicación exógena de auxinas induce la formación de raíces en brotes cultivados *in vitro*, y que diversas auxinas aisladas en combinación con otras, pueden ser utilizadas en el proceso de rizogénesis, cuyas concentraciones entretanto, varían de acuerdo a la especie.

Bitters *et al.*, (1972), afirman que el enraizamiento depende de un nivel adecuado de carbohidratos, y que algunos de estos compuestos son más eficientes que otros. Según Bidwell (1979), ocurre una interacción de nivel de carbohidratos con un nivel hormonal endógeno.

Para Erickson & Bitters (1953), la diferenciación de tejidos vasculares *in vitro* es afectada por la presencia de auxinas y sacarosa.

2. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la técnica de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) sobre diferentes portainjertos en El Salvador.

ESPECÍFICOS

- Evaluar la técnica de Termoterapia *in vitro* de estacas, como herramienta para contribuir al saneamiento de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) en El Salvador.
- Evaluar la técnica de Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos, como herramienta para contribuir al saneamiento de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) en El Salvador.
- Evaluar la Desinfección y Germinación *in vitro* de “Mandarina Cleopatra” (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.), *Citrus volkameriana*, Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) al ser utilizados como patrón para microinjerto.
- Evaluar el desarrollo de las plántulas de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) obtenidas mediante la técnica de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos, en condiciones de laboratorio.

3. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H₀)

Las técnicas de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos sobre diferentes portainjertos, no interfieren en el saneamiento de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.), en El Salvador.

Hipótesis Experimental (H_E)

Las técnicas de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos sobre diferentes portainjertos, interfieren en el saneamiento de “Limón pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.), en El Salvador.

4. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación y Descripción del Área de Estudio

El Trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónes” (ENA), ubicada en San Andrés, Kilómetro 33½. Carretera a Santa Ana, Departamento de La Libertad, El Salvador (Apéndice 2).

4.2 Material Vegetativo

El material vegetativo que se utilizó para el desarrollo de la investigación, correspondiente a la colección de cítricos, fue donado por el Banco de Germoplasma propiedad del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), ubicado en San Andrés, Departamento de La Libertad (Apéndice 3), y estuvo constituido por semillas de “Mandarina Cleopatra” (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) y varetas de “Limón Pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.).

Asimismo el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y la Agrupación de Viveristas de Agrios S.A. (AVASA), ambos de España, donaron a la ENA semillas de *Citrus volkameriana*, Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), las cuales a su vez, fueron puestas a disposición del tesista para llevar a cabo la investigación.

Cada patrón se sometió a las diferentes etapas correspondientes a la fase de laboratorio, siendo éstas:

1. Desinfección y germinación *in vitro* de semillas.
2. Desinfección y siembra *in vitro* de microestacas.
3. Termoterapia aplicada a microestacas.
4. Microinjertación *in vitro* de meristemos.

4.3 PRIMERA FASE EXPERIMENTAL

4.3.1 Preparación de Medios de Cultivo

Inicialmente se prepararon todas las soluciones madre, las cuales contenían macronutrientes, micronutrientes y complejos vitamínicos (Murashige & Skoog, 1962).

A continuación, en un Erlenmeyer se adicionaron las cantidades de soluciones madre correspondientes para preparar la cantidad de medio que se necesitaba, finalizado el paso anterior, se agregó azúcar comercial y se aforó hasta alcanzar el volumen deseado. Todo se hizo en agitación constante, posteriormente se midió el pH de la solución hasta alcanzar 5.70, al término de esta fase, se adicionó Phytigel como agente gelificante. Finalmente se llevó al autoclave, en donde se esterilizaron por 15 minutos a 121⁰C y 15 libras de presión por pulgada cuadrada.

4.3.2 Modificaciones a los Medios de Cultivo

En la tabla número 1, se describen los tipos de medios que se utilizaron en las diferentes etapas de la investigación, siendo este de Murashige & Skoog (MS, 1962), el primero de tipo basal, y el segundo llevaba incorporado Vitaminas de White, esto se hizo para evidenciar los mejores resultados durante las diferentes etapas del cultivo.

TABLA N^o. 1. Medios de Murashige & Skoog (MS, 1962) que se utilizaron en las diferentes fases experimentales. El número de repeticiones para cada tipo de medio utilizado fue de treinta.

Fase - Etapa	Tipo de medio	Componentes	Concentración	Número de repeticiones
Germinación de semillas	MS BASAL	Sales de Murashige & Skoog, 1962.	Completas	30
Siembra de microestacas en termoterapia	MS BASAL	Sales de Murashige & Skoog, 1962.	Completas	30
Microinjertación	MS + Vitaminas de White.	Sales de Murashige, 1962 y & Vitaminas de White, 1972.	1.0 mgL ⁻¹	30
Desarrollo de microinjerto	MS + Vitaminas de White.	Sales de Murashige & Vitaminas de White, 1972.	1.0 mgL ⁻¹	30

4.4 SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

4.4.1 Desinfección *in vitro* de Semillas por Inmersión en Solución de Hipoclorito de Sodio

Basándose en los métodos de esterilización *in vitro* para cítricos probados por Giladi *et al.* (1979), retomados por Khattak *et al.*, (1990), Borges *et al.*, (1997), Koziara (2001), y actualizados por Cuéllar Zometa (2002) al aplicarlos en pruebas similares con otros cítricos; se colocaron las semillas en grupos de 10 en trozos de gasa de 10 * 10 cm. formando una especie de paquete y suavemente se dispusieron dentro de una caja *petri* cerrada para evitar la deshidratación.

Cuando las semillas necesarias estuvieron listas, se colocaron en un tubo de ensayo de unos 3 cm. de diámetro y se agregó la solución desinfectante la cual contenía Hipoclorito de Sodio al 0.2% + 1 gota de Tween-20; inmediatamente se taparon con papel parafilm para desinfectarlas por inmersión durante un periodo de 10 minutos (Imagen 1).



Imagen 1: Desinfección *in vitro* de semillas Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort), Citrumelo, *Citrus volkameriana* y Carrizo (*Citrange carrizo*) que se utilizaron como patrones.

Los enjuagues se hicieron dentro de la cámara de flujo laminar estéril con agua destilada esterilizada, en una serie de repeticiones de 5 a 7, con una duración mínima de 10 segundos en los primeros y una de 5 minutos en la última en busca de eliminar todos los residuos de solución desinfectante.

4.4.2 Siembra y Germinación *in vitro* de Semillas de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort), Citrumelo, *Citrus volkameriana* y Citrange carrizo para Obtener el Portainjerto

Tomando como base la metodología propuesta por Zuccherelli (1979), y actualizada por Cuéllar Zometa (2002), las semillas fueron sembradas individualmente en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo cada uno 25 mililitros de medio Murashige & Skoog Basal (1962), sin azúcar ni vitaminas, solidificado con 1.2 gL⁻¹ de Phytigel.

De acuerdo a lo propuesto por Monteverde *et al.*, (1981) y Cuéllar Zometa (2002), cada tubo fue incubado a temperatura constante (27°C) en condiciones de completa oscuridad durante 3 semanas. Las plántulas que medían de 3-5 centímetros de longitud y de 1.6-1.8 milímetros de diámetro fueron utilizadas como patrón-portainjerto (Imagen 2).



Imagen 2: Plántulas de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort), Citrumelo, *Citrus volkameriana* y Citrange carrizo de 3-5 centímetros de longitud y de 1.6-1.8 milímetros de diámetro utilizadas como patrón-portainjerto

4.5 TERCERA FASE EXPERIMENTAL

4.5.1 Obtención de Varetas para Germinación de Yemas

En esta fase se empleó la metodología sugerida por Navarro (1992), Quintero *et al.*, (1997); y revalidada por Cuéllar Zometa (2002), en donde se utilizaron varetas de 7.0 - 8.0 cm. de altura, las cuales fueron extraídas de arbustos de "limón pérsico" que presentaban síntomas de enfermedades virales, además se procuró que éstas tuvieran entre 5-7 yemas útiles (Imagen 3).



Imagen 3. Varetas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss) de 7.0 - 8.0 cm. de altura, con una o dos yemas que fueron utilizadas en ésta fase experimental.

4.5.2 Desinfección *in vitro* de Microestacas

Según Cuéllar Zometa (2002), las varetas debieron lavarse colocándolas dentro de un recipiente con agua y abundante jabón líquido, con una brocha de 1" se frotaron cuidadosa pero intensamente para remover los restos de tierra acumulada en campo, finalmente se enjuagaron individualmente con agua al tiempo (Imagen 4).



Imagen 4: Lavado superficial de las varetas de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bears) que contenían las yemas que se hicieron germinar.

Las varetas de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bears) fueron desinfectadas por inmersión durante diez minutos en una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.5 % conteniendo 1 gota de Tween-20 como surfactante; inicialmente se colocaron en grupos de 10 en una probeta de vidrio y se agregó la solución, inmediatamente, la probeta fue sellada con papel parafilm y se agitó con movimientos de arriba hacia abajo (Imagen 5).



Imagen 5: Desinfección superficial de varetas de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bears), previo a su germinación *in vitro*.

Transcurrido los diez minutos y dentro de la cámara de flujo laminar, se hicieron de 5 a 7 enjuagues con agua destilada estéril, con una duración mínima en los primeros y una de 5 minutos en la última en busca de eliminar todos los residuos de solución desinfectante (Imagen 6).



Imagen 6: Enjuague de varetas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss) dentro de la cámara de flujo estéril.

4.5.3 Siembra *in vitro* de Varetas

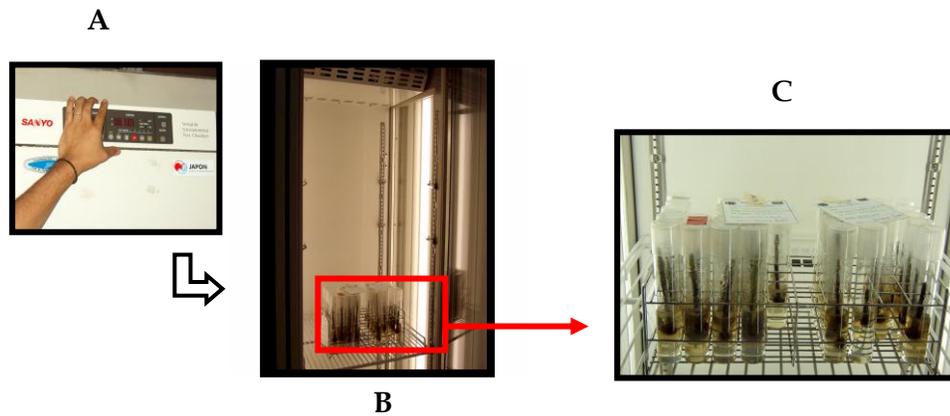
Después de la desinfección, las varetas (ya para ese momento medían 5.0 cm.) se sembraron individualmente en un tubo de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo cada uno 25 ml de medio Murashige & Skoog Basal (1962), sin vitaminas ni azúcar, solidificado con 1.2 gL⁻¹ de Phytigel (Imagen 7).



Imagen 7. Siembra de varetas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss) en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo cada uno 25 ml de medio.

4.5.4 Aplicación de Termoterapia a Varetas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss): Saneo y Germinación de Yemas

Finalizado el paso anterior, y tomando como base las investigaciones hechas por Roistacher & Kitto (1977), Navarro *et al.*, (1980) y revalidada por Cuéllar Zometa (2002), las varetas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss) se sometieron a Termoterapia dentro de la Cámara Versátil de Clima a 32°C, las 24 horas del día, y 1,600 lux de iluminación, por un período de 3 semanas para procurar la desinfección viral y germinación de yemas (Esquema 1).



Esquema 1: Sometimiento a Termoterapia de varetas de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bearss) a 32°C, 1,600 lux de iluminación las 24 horas del día, dentro de la Cámara Versátil de Clima.

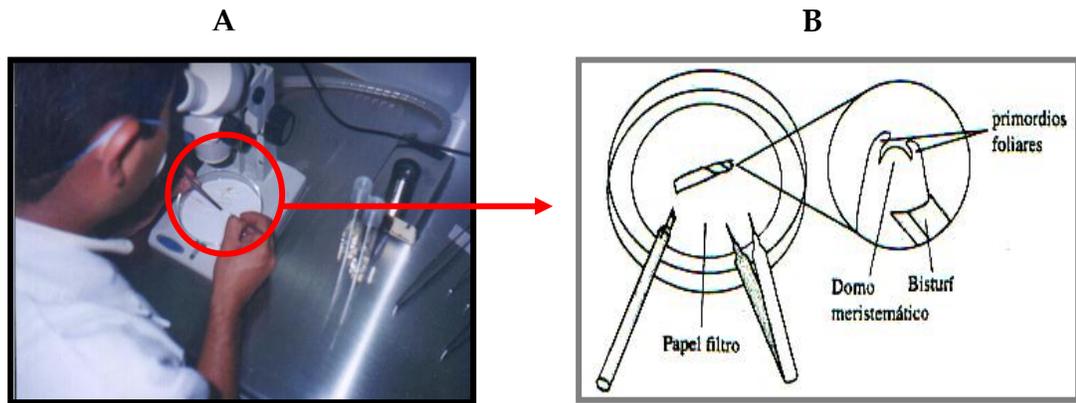
Transcurrido ese tiempo, las yemas se desarrollaron y alcanzaron aproximadamente de 8.0 a 10.0 mm. (Imagen 9), en ese momento estaban listas para el siguiente paso: **preparación del ápice meristemático** (meristemo de 0.1 mm), mediante su aislamiento y extracción.



Imagen 9: Germinación de yemas *in vitro* de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bearss), previo al aislamiento y extracción de meristemas.

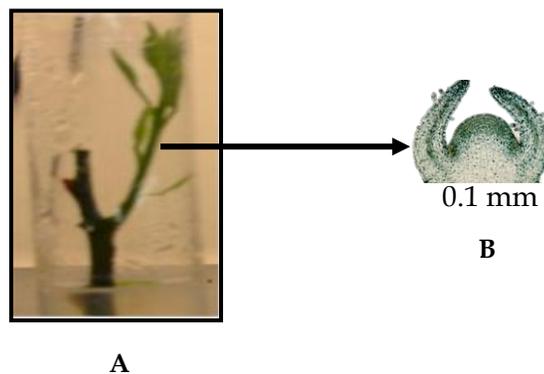
4.5.5 Aislamiento y Extracción de Meristemas

Haciendo una fusión entre las metodologías empleadas por Surga (1988), Mosella & Ascui (1991), Navarro (1992) y Cuéllar Zometa (2002), la extracción del meristemo se hizo con la ayuda de un microscopio estereoscópico dentro de la cámara de flujo estéril (Esquema 2).



Esquema 2. (A) Aislamiento y extracción del meristemo apical, (B) Forma del meristemo aislado.

El meristemo medía de 0.1-0.2 mm y fue aislado y extraído de la yema axilar cuyo meristemo principal comprendía entre uno y dos primordios foliares (Esquema 3).

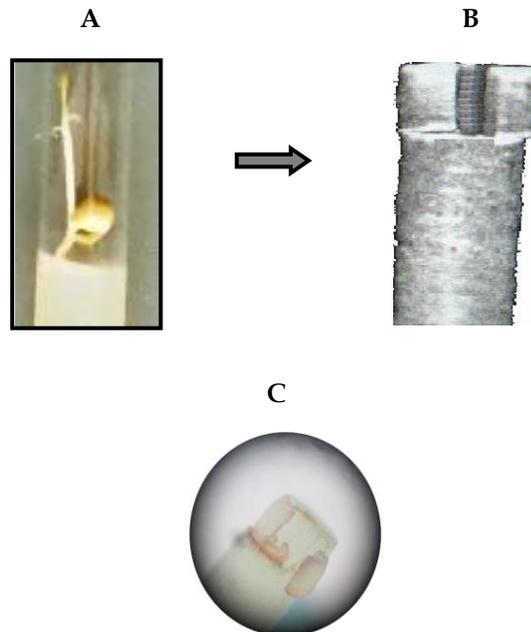


Esquema 3. (A) Yema de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bearss.) Germinada *in vitro*, (B) Ápice Meristemático Aislado y Extraído (de 0.1 a 0.2 mm).

4.6 CUARTA FASE EXPERIMENTAL

4.6.1 Microinjertación *in vitro* de Ápices Meristemáticos

Continuando con la metodología sugerida por Navarro (1992), Peña & Estrada (1995), y Cuéllar Zometa (2002), dentro de la cámara de flujo estéril, se extrajo de cada uno de los tubos, los patrones (portainjertos) germinados en condiciones estériles, y se decapitaron alrededor de 1.5 cm. del epicótilo y los cotiledones y yemas axilares fueron removidos. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, el ápice meristemático (ápice injerto), se colocó en una escisión hecha a la corteza del epicótilo en forma de T invertida a 1.0 milímetro de longitud de la incisión vertical y de 1-2 milímetros en dirección al corte horizontal (Esquema 4).



ESQUEMA 4: (A) Germinación ideal *in vitro* del patrón a microinjertar, (B) Decapitado de patrón para luego hacer una incisión en forma de T invertida (C) Microinjertación del ápice meristemático sobre el patrón decapitado, nótese dentro del patrón blanco el ápice meristemático.

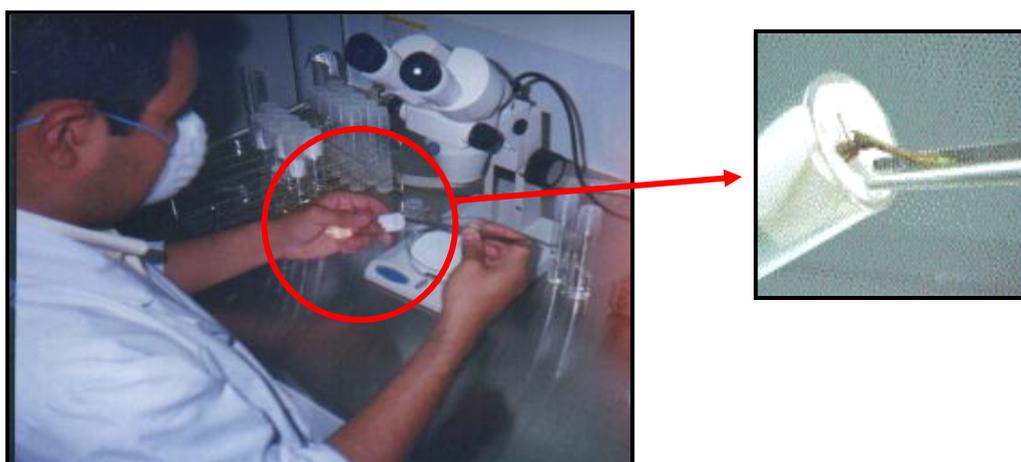
4.6.2 Siembra *in vitro* de Plántulas Microinjertadas

En ésta fase se tomó como base las pruebas hechas por Hon - Ji (1984), Starrantino *et al.*, (1986) y Cuéllar Zometa (2002) en donde las plántulas microinjertadas fueron cultivadas en un medio líquido de Murashige & Skoog (1962), modificado con Vitaminas de White (1972).

La concentración de la fuente de azúcar fue de 75 gL^{-1} , esto según el planteamiento de Navarro *et al.*, (1975) y Cuéllar Zometa (2002), en donde establecen que una mayor fuente de carbono facilita el buen desarrollo de las vitroplantas microinjertadas.

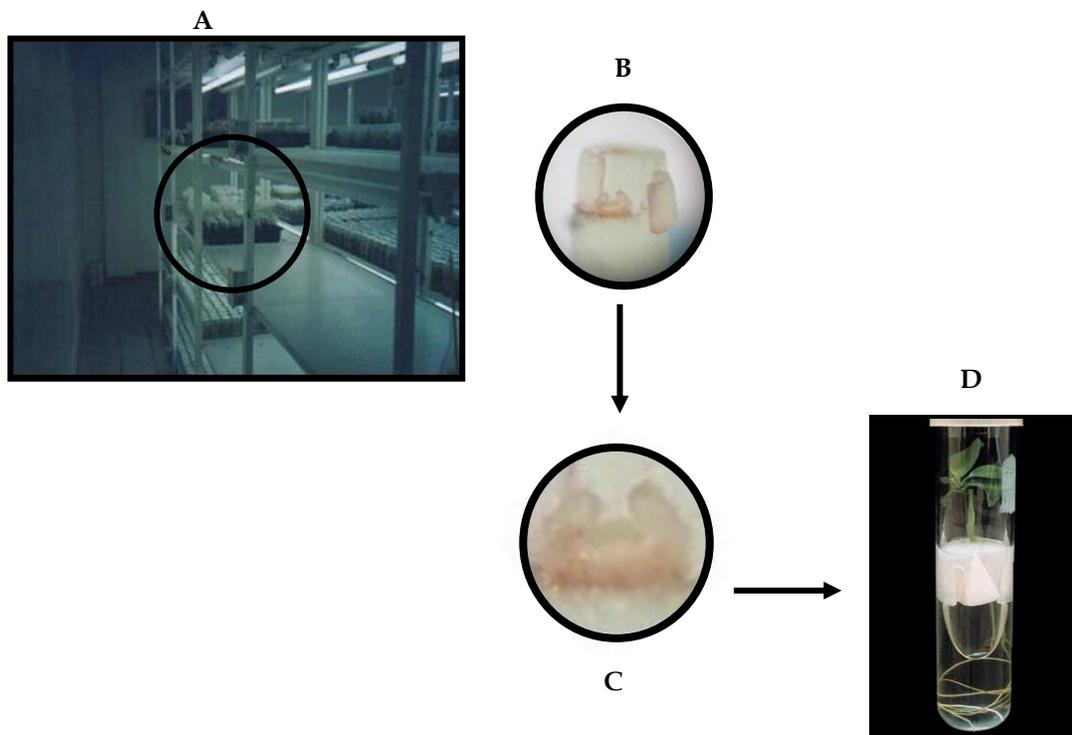
El medio nutritivo se colocó en tubos de ensayo de 25×150 milímetros y cada uno contenía 20 mililitros (Navarro, 1992).

Basándose en investigaciones hechas por González *et al.* (1977) y Cuéllar Zometa (2002), la plántula injertada se colocó entre un papel filtro perforado en su centro, el cual sirvió como soporte en el tubo de vidrio, de manera que el sistema radical quedara en contacto con el medio (Esquema 5).



Esquema 5: Siembra de la plántula microinjertada de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Bearss) entre un papel filtro perforado en su centro.

La plántula microinjertada se introdujo en un tubo de ensayo de 25 x 150 milímetros conteniendo cada uno 20 mililitros de medio Murashige & Skoog en estado líquido, modificado con vitaminas de White, esto con el objetivo de permitir el desarrollo óptimo del microinjerto; en éstas condiciones y basándose en investigaciones hechas por Murashige & Tucker (1969) y Monteverde *et al.* (1981), las plántulas se llevaron al cuarto de crecimiento en donde permanecieron dos semanas sometidas a temperatura constante (27°C), con un fotoperíodo de 16 horas diarias y 1,600 lux de iluminación, después de ese período se pudo apreciar la cicatrización y pegue del ápice microinjertado para el posterior desarrollo de la plántula microinjertada (Esquema 6).



Esquema 6: (A) Cuarto de Crecimiento, (B) Microinjerto *in vitro*, (C) Cicatrización del ápice microinjertado (Color café abajo del meristemo) y (D) Plántula microinjertada en desarrollo.

4.7 QUINTA FASE EXPERIMENTAL

4.7.1 Criterios de Evaluación

Los resultados obtenidos en la presente investigación, se analizaron tomando en cuenta los siguientes criterios:

4.7.2 Variables en Estudio

1. Variable A: Termoterapia
2. Variable B: Patrones:
 - P₁: *Citrus volkameriana* Pasquale.
 - P₂: Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*)
 - P₃: Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan.)
 - P₄: Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*)

4.7.3 Otras Variables Consideradas

1. Crecimiento en centímetros del patrón utilizado (variable cuantitativa).
2. Color del patrón germinado (variable cualitativa).
3. Efecto de la Termoterapia en la Germinación de las Yemas (Variable cualitativa).
4. Número de microinjertos logrados (Variable cuantitativa).
5. Oxidación de microinjertos (Variable cualitativa).
6. Crecimiento (cm.) de la yema injertada (variable cuantitativa).
7. Número de hojas de la yema injertada (variable cuantitativa).
8. Color de hojas de la yema injertada (variable cualitativa).

4.7.4 Factores Constantes

1. Microinjerto.
2. Tipo de yemas (Nodales).
3. Germinación *in vitro* de yemas.
4. Germinación *in vitro* de patrones.
5. Medio MS sin azúcar y sin reguladores de crecimiento.
6. pH: 5.70
7. Tipo de recipiente (tubos de ensayo de 25 x 150 mm).
8. Tapas plásticas.
9. Tipo de injerto: Ápice Meristemático.

4.7.5 Unidad Experimental

Un patrón microinjertado dentro de cada tubo.

4.7.6 Observaciones

Las observaciones se realizaron cada dos semanas durante cinco meses, con un total de 10 evaluaciones, las cuales fueron registradas en Hojas de Datos especialmente diseñadas para recolectar datos del desarrollo *in vitro* de patrones y varetas respectivamente (Apéndice 4 y 5), cabe mencionar que cada uno de los tratamientos tuvo 30 repeticiones con 60 unidades experimentales equivalentes al 100%.

4.8 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente mediante el programa SX STATISTIX Versión 3.5 (Analytical Software, 1985-1991).

La prueba empleada fue un Análisis de Varianza (ANDEVA) para cada uno de los factores a evaluar con un nivel de significancia de $< 0.01\%$.

5. RESULTADOS

5.1 Germinación *in vitro* de Citrumelo

El porcentaje de germinación de Citrumelo, en la décima evaluación, refleja que las siembras realizadas en las fechas 28/12/2002 y 28/01/2003, fueron las que tuvieron mayor porcentaje de germinación, presentando estos un número promedio de 45 patrones germinados equivalentes a 90% cada uno, provenientes de un total de 50 semillas sembradas.

5.2 Germinación *in vitro* de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan.)

Durante la décima evaluación, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan.), reflejó un mayor porcentaje de germinación en las siembras realizadas en las fechas 28/12/2002 con un promedio de 33 patrones germinados equivalente al 66%, y 28/01/2003 con un promedio de 45 patrones germinados equivalentes a 90%, de un total de 50 semillas sembradas.

5.3 Germinación *in vitro* de *Citrus volkameriana*

Durante la décima evaluación de *Citrus volkameriana*, se puede observar un mayor porcentaje de germinación en las siembras realizadas en las fechas 28/12/2002 con un promedio de 45 patrones germinados equivalente al 66%, así como 06/01/2003 con un promedio de 49 patrones germinados equivalentes a 90%, de un total de 50 semillas sembradas.

5.4 Germinación *in vitro* de *Citrango carrizo*

A lo largo de toda la evaluación *Citrango carrizo* mostró un excelente porcentaje de germinación en todas las siembras realizadas con promedios mayores que los otros tres patrones (arriba de los 45 patrones germinados de un total de 50 semillas sembradas), equivalentes a un rango de porcentaje entre 70% y 90%.

5.5 Porcentajes de Contaminación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizadas como patrón para microinjerto al final de la evaluación

El Gráfico N° 1, muestra los porcentajes de contaminación de los cuatro patrones utilizados para Microinjerto al final de la evaluación, estos presentaron índices bastante inferiores al 100%, como producto de la depuración de la metodología empleada; el menor porcentaje de contaminación le corresponde a *Carrizo* (10%), seguido por Citrumelo (12.5%); *Citrus volkameriana* (13.6%) y Mandarina Cleopatra (15%).

5.6 Porcentajes Necrosamiento *in vitro* de de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizadas como patrón para microinjerto al final de la evaluación.

El Gráfico N° 2, muestra porcentajes de necrosamiento de los cuatro patrones utilizados para Microinjerto al final de la evaluación, nuevamente Citrumelo presentó el menor porcentaje (0%), seguido por *Carrizo* (2%), Mandarina Cleopatra y *Citrus volkameriana*, los cuales presentaron 5% cada uno.

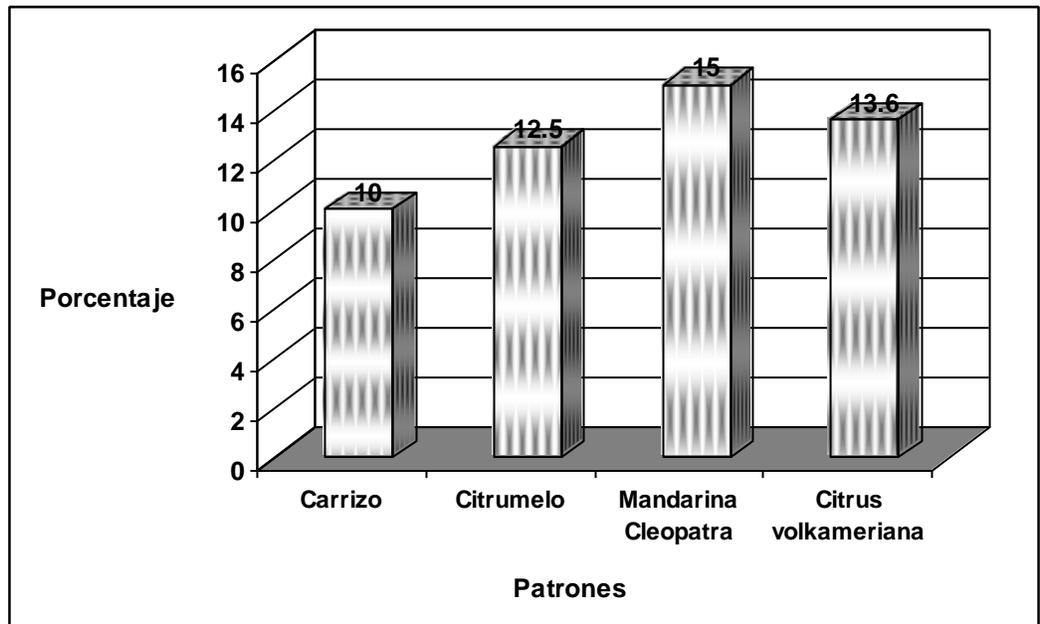


Gráfico No. 1 Porcentajes de Contaminación *in vitro* de los cuatro patrones utilizados como patrón para microinjerto al final de la evaluación.

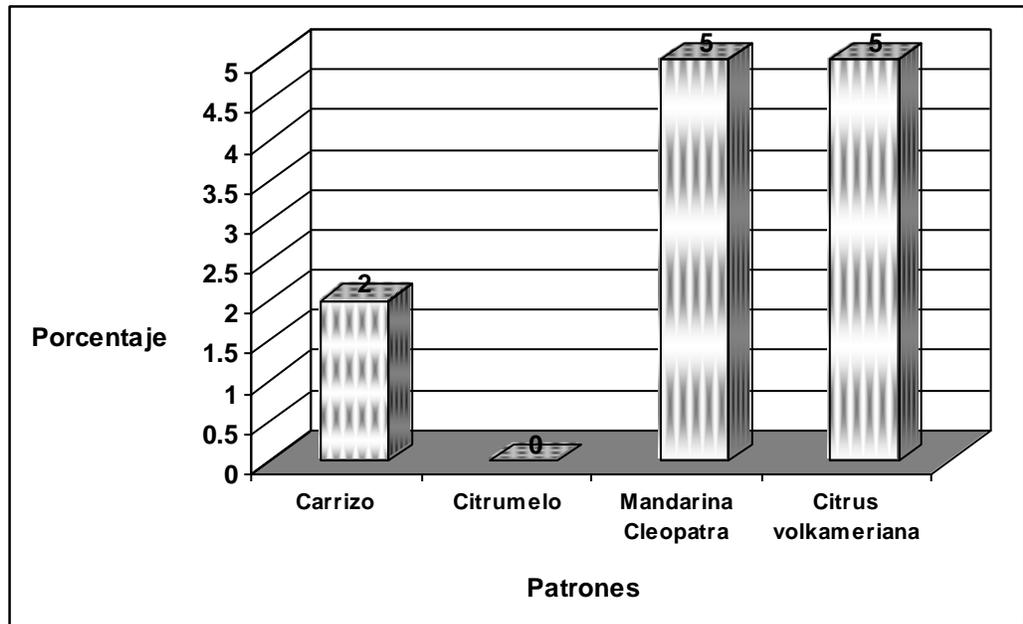


Gráfico No. 2. Mejores Porcentajes de Necrosamiento *in vitro* de los cuatro patrones utilizados como patrón para microinjerto al final de la evaluación

5.7 Porcentajes de Germinación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizadas como patrón para microinjerto.

El Gráfico N° 3, muestra los porcentajes de germinación en la décima evaluación de los cuatro patrones utilizados para Microinjerto, éstos presentaron diferencias marcadas las cuales se pueden evidenciar; el mayor porcentaje le corresponde a *Carrizo* (56.7%), seguido por *Citrus volkameriana* (27.5%), Citrumelo (14.2%) y Mandarina Cleopatra (1.6%).

5.8 Mejores porcentajes de Germinación *in vitro* de los cuatro patrones utilizados como patrón para microinjerto al final de la evaluación.

El Gráfico N° 4, muestra los mejores porcentajes de germinación al final de evaluación de los cuatro patrones utilizados para Microinjerto, éstos presentaron diferencias marcadas las cuales se pueden evidenciar; el mayor porcentaje le corresponde a *Carrizo* (80%), seguido por *Citrus volkameriana* (60%), Mandarina Cleopatra (38%) y Citrumelo (45%).

5.9 Porcentajes de Germinación *in vitro* de Yemas

El Gráfico N° 5, muestra el promedio de germinación de yemas como producto de la Termoterapia, se pudo observar un evidente aumento en la germinación a medida que las fechas de siembra en Termoterapia avanzaban.

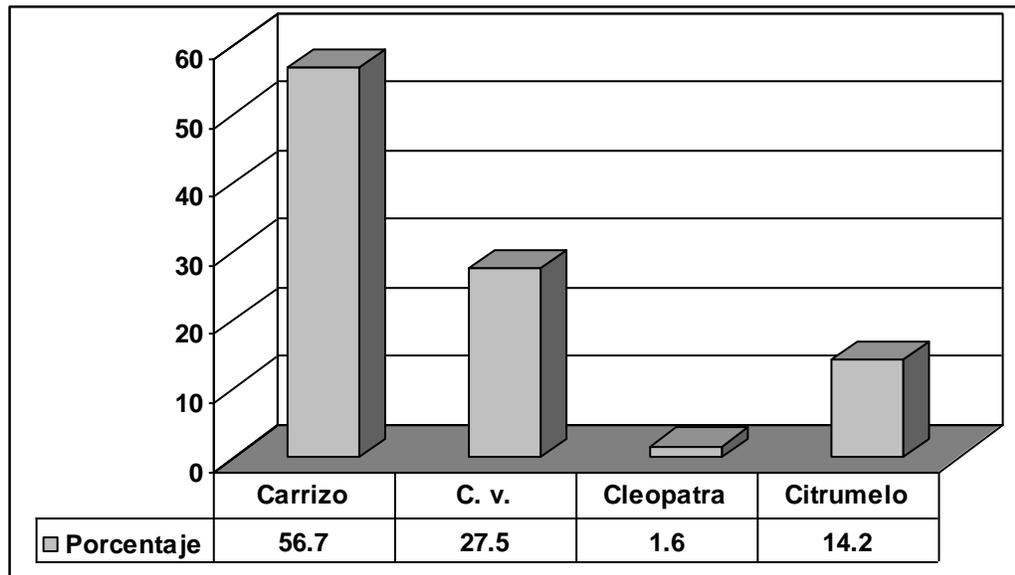


Gráfico No. 3. Germinación *in vitro* de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizadas como patrón para microinjerto.

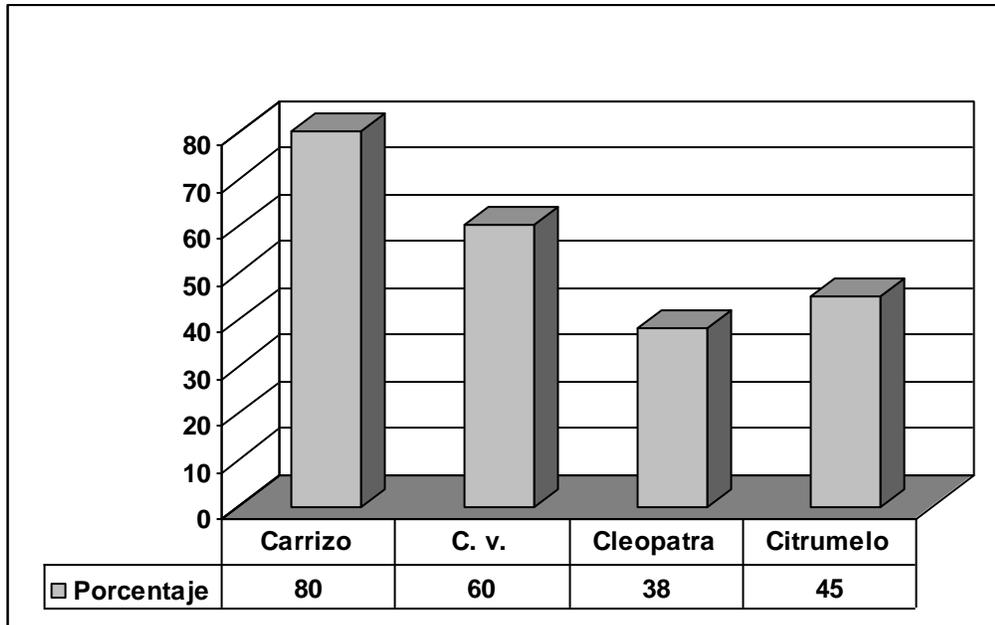


Gráfico No. 4 Mejores porcentajes Germinación de Semillas de Citrumelo, Carrizo, Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *Citrus volkameriana* utilizadas como patrón para microinjerto.

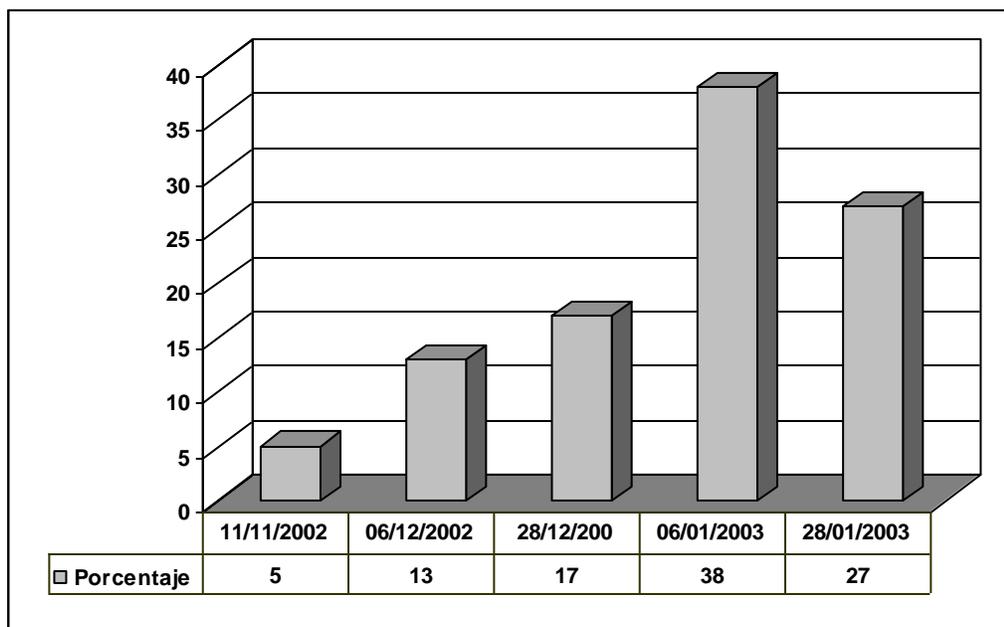


Gráfico No. 5. Porcentaje de Germinación de Yemas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss.) a lo largo de todas las fechas de evaluación

5.10 Microinjertación *in vitro* de Ápices Meristemáticos y Prendimiento de Microinjertos

En el Gráfico N° 6 se presentan los datos sobre microinjertos logrados al final de la evaluación; se observa al patrón Carrizo como el único que mostró evidencias de un proceso de **microinjertación exitosa (Número 1)**; en contraste con las evidencias mostradas por los patrones, *Citrumelo*, Mandarina Cleopatra y *C. volkameriana* en donde claramente se observa una **microinjertación no exitosa (Número 2)**. Es importante hacer notar que los porcentajes de germinación de patrones resultaron ser directamente proporcionales al prendimiento y desarrollo del microinjerto *in vitro*.

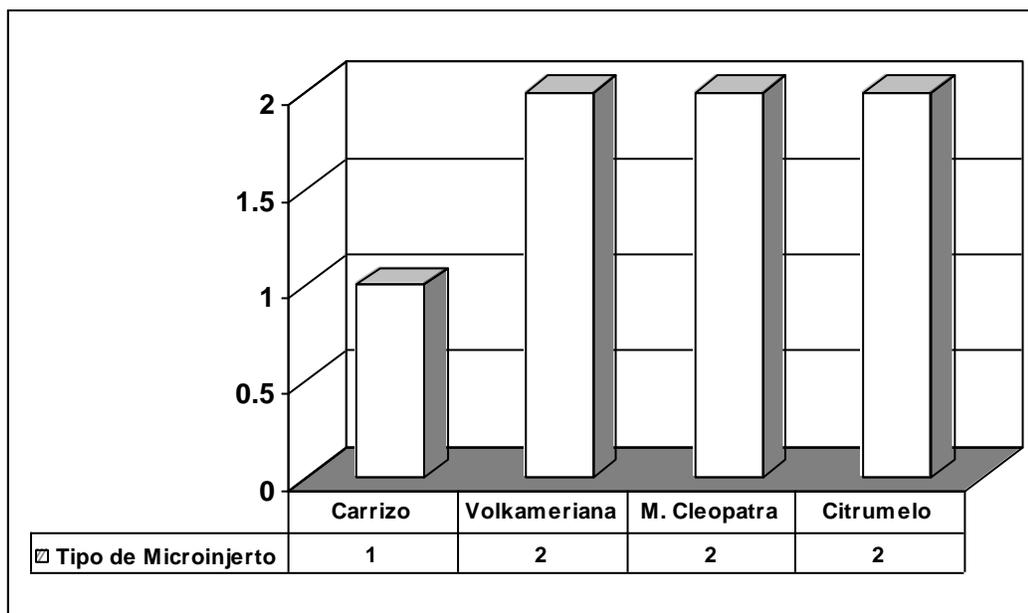


Gráfico No. 6. Porcentajes de Prendimiento de Microinjertos *in vitro* en los cuatro patrones utilizados durante la evaluación. (1 = Microinjertación exitosa; 2 = Microinjertación exitosa)

El Gráfico N° 7, muestra el promedio de número de hojas luego del proceso de microinjertación; en el mismo se observa que el patrón Carrizo fue el único en regenerar hojas bifoliadas, las cuales son características de un microinjerto exitoso, Citrumelo, Mandarina Cleopatra y *C. volkameriana* regeneraron hojas trifoliadas (microinjertos no exitosos).

5.11 Coloración de las Hojas

El Gráfico N° 8, muestra el promedio del color de hojas que presentaron los microinjertos prendidos, donde se puede observar, que los patrones Citrumelo, Mandarina Cleopatra y *C. volkameriana* presentaron el color verde claro (Número 2) y Carrizo el color verde oscuro (Número 1), siendo este último el color ideal de la especie que indica vitalidad y éxito en la microinjertación.

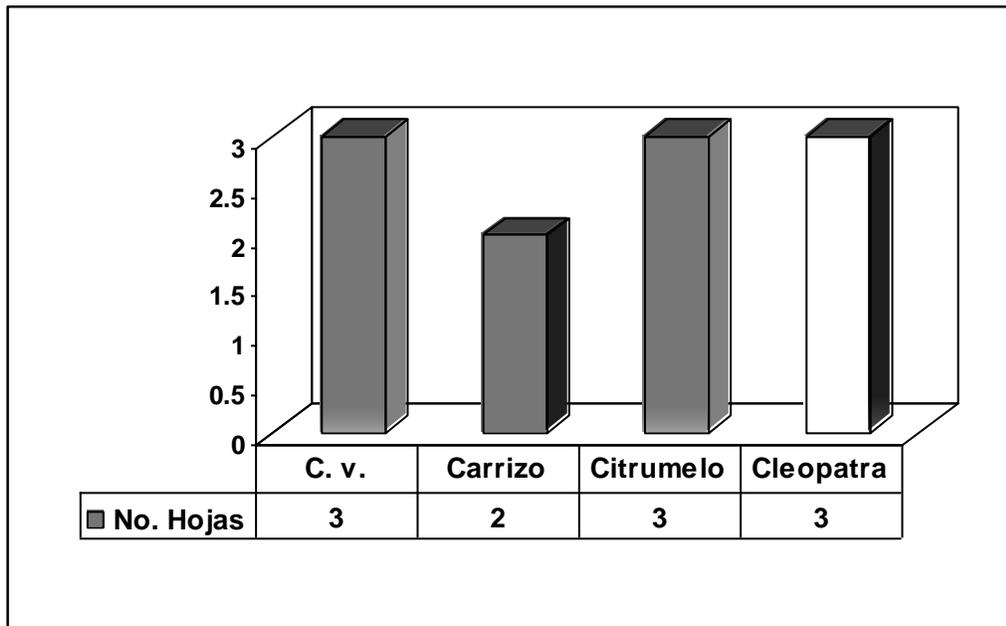


Gráfico No. 7. Promedio del número de hojas de los microinjertos al final evaluación

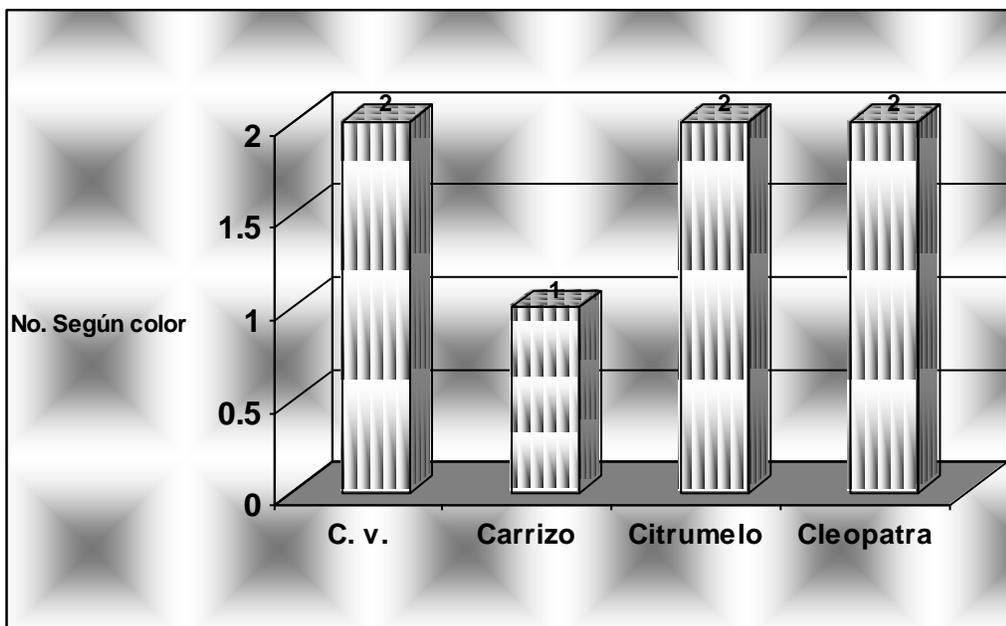


Gráfico No. 8. Promedio del color de hojas de los microinjertos, Exitosos (2 =Verde Claro; 1 = Verde Oscuro).

5.12 ANDEVA y Separación de Medias de la Germinación *in vitro* de Patrones

Las Tablas N° 2 y 3, muestran el Análisis de Varianza aplicado a la germinación *in vitro* de los 4 patrones (Variable B), así como la separación de medias al final de la evaluación respectivamente.

Para la Separación de medias se consideraron 400 casos efectivos, de éstos, 396 fueron evaluados y 4 se perdieron durante el análisis; esto indica que el proceso de germinación es independiente en cada uno de los patrones aún cuando todos poseen características anatómicas idénticas, tanto el ANDEVA como la comparación de medias reflejan un nivel de alta significancia con un error de 0.0000.

Tabla No. 2. ANDEVA del proceso de Germinación *in vitro* de Patrones (Variable B).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F Calculada	Significancia
Patrones	3	15.97	5.323	35.50	0.0000
Error	392	58.78	1.499 E-01		
Total	395	74.75			

Tabla No. 3. Separación de Medias de la Germinación *in vitro* de Patrones (Variable B).

Patrones <i>in vitro</i>	Medias	Grupos Homogéneos
<i>Carrizo</i>	5.600 E-01	I
<i>Citrus volkameriana</i>	2.800 E-01	.. I
Mandarina Cleopatra	1.414 E-01	.. I I
<i>Citrumelo</i>	2.062 E-01I

5.13 ANDEVA y Separación de Medias de la Germinación *in vitro* de Varetas

Las Tablas N° 4 y 5, muestran el Análisis de Varianza aplicado a la germinación *in vitro* de varetas (Variable A) al final de la evaluación, así como la comparación de medias respectivamente.

Para la Separación de medias se consideraron 247 casos efectivos, de éstos, 244 fueron evaluados y 3 se perdieron durante el análisis; esto indica que la germinación es independiente en cada una de las fechas y por ende entre cada muestra de varetas (Variable A), aún cuando provienen de una población idéntica, tanto el ANDEVA como la comparación de medias reflejan un nivel de alta significancia con un error de 0.0000.

Tabla No. 4. ANDEVA y Comparación de Medias del proceso de Germinación *in vitro* de Varetas (Variable A)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F Calculada	Significancia
Termoterapia (Variable A en 5 Fechas evaluadas)	4	12.95	3.238	16.83	0.0000
Error	242	46.56	1.924 E-01		
Total	246	8.287 E+04	59.51		

Tabla No. 5. Comparación de Medias de la Germinación *in vitro* de Varetas (Variable A) en 5 Fechas Diferentes

Fechas		Medias	Grupos Homogéneos
Fecha 4	06/11/2003	7.600 E-01	I
Fecha 5	28/01/2003	5.510 E-01	.. I
Fecha 3	28/12/2002	3.400 E-01	.. I I
Fecha 2	06/12/2002	2.600 E-01 I
Fecha 1	11/11/2002	1.042 E-01 I

6. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Contaminación *in vitro* de Patrones

Los análisis realizados en las diferentes fechas de evaluación, muestran que al inicio de la investigación se obtuvo un elevado porcentaje de contaminación, presentando promedios bastante variados (*Carrizo* 44%, *Citrumelo* 70%, *Citrus volkameriana* y *Mandarina Cleopatra* 90%).

Esto puede deberse a que en el momento de la preparación de los patrones hubo una excesiva manipulación que ha podido contaminar tanto al medio de cultivo como al explante, a pesar de haberse tomado todas las medidas de asepsia correspondientes, incluso utilizando tapas plásticas selladas con plástico estéril.

Lo anterior no coincide con el reporte de Gómez & Huaranca (1997) acerca de que el uso de tapas de plástico en el cierre de los medios de cultivo reducen la contaminación de semillas cultivadas *in vitro*.

Esta contaminación podría deberse también a infecciones internas como lo menciona Pierik (1990), quien afirma que a pesar de una “buena” esterilización química del material vegetal, si después se obtiene contaminación, entonces es producida por infecciones internas, que pueden constituir un problema importante causadas por microorganismos que se encuentran presentes en el interior de la misma planta y no pueden ser eliminados por esterilización externa.

El uso de yemas provenientes de germinación aséptica no redujo el problema de contaminación ya que fue el responsable de los altos porcentajes de contaminación encontrados en el ensayo.

6.2 Germinación *in vitro* de Patrones

Cuando la germinación de semillas se realiza en condiciones *in vitro*, en algunos casos los requerimientos y factores implicados aumentan considerablemente, así, factores como pH, hidratos de carbono, sales minerales, vitaminas y gelificantes del medio de cultivo son importantes, siendo los reguladores de crecimiento, los que permiten controlar (inhibir/inducir) la germinación de las semillas (Devlin, 1980).

Durante la presente investigación, los análisis realizados en las diferentes fechas de evaluación muestran que se obtuvo un porcentaje de germinación bastante variable, siendo Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) el patrón con mejores resultados, con un promedio de 56% encima de un 28% de *Citrus volkameriana*, 14% de Citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y 2% de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.). Esto puede deberse a que en el momento de la Desinfección y Establecimiento *in vitro* de patrones para su Germinación, también hubo una excesiva manipulación la cual afectó la capacidad germinativa de las semillas.

Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos en Brasil por De Andrade & Martins (2003), quienes en pruebas similares observaron que Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) y *C. volkameriana* presentaban mejores resultados que el resto de patrones sugeridos para microinjerto; sin embargo, en la presente investigación los resultados coinciden en algunos aspectos con los planteamientos hechos por Brinks (2000) quien sostiene que las semillas pierden viabilidad debido a la desnaturalización de proteínas, así como a las mutaciones que en ellas ocurren lo que influye directamente en su capacidad germinativa.

Por otro lado se pudo evidenciar algunos los planteamientos de los brasileños referentes al porcentaje de germinación y supervivencia de patrones, el cual, según los autores es influenciado por la manipulación, la fragilidad y la respuesta al estrés fisiológico *in vitro* que enfrenta cada patrón.

Castle *et al.*, (1993), al estudiar los patrones de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), *C. macrophylla* y Citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), llegaron a la conclusión que el Citrange Carrizo era el que alcanzaba con más rapidez y mejores características el momento para la injertación.

Asimismo, el comportamiento de *C. volkameriana* obtenido en este trabajo coincide con lo señalado por González *et al.*, (1977), en lo relativo al vigor de este patrón.

Katyal (1949), encontró que los porcentajes de germinación para Citranges eran de 15.6% para una temperatura entre 25.5°C y 26.4°C; así mismo concluyó que los valores de los porcentajes de germinación de Cidra y Grapefruit parecían ser los más altos entre las especies y variedades de cítricas usadas en el experimento.

En la presente investigación, los datos obtenidos en Citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), concuerdan aproximadamente con los obtenidos por Durán Rojas (1999), tomando en cuenta el criterio de selección y la calidad fisiológica del patrón empleado para Microinjerto.

Algunos autores (Ostapenko, 1958; Singh, 1961; Vasil, 1958; y Visser & Tillekeratre, 1958), han considerado la germinación de los patrones *in vitro* como una prueba confiable para determinar la viabilidad de las semillas.

Leal (1969), encontró diferencias en los porcentajes de germinación de *P. trifoliata* (38%), 34.2% de Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), *Citrus volkameriana* (60.6%), Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) con 71%. *P. trifoliata* fue germinado en medio conteniendo sacarosa al 30%; los restantes en medio conteniendo sacarosa al 20%.

También hay evidencia firme de la existencia de sustancias o procesos inhibitorios ya que en realidad tanto los promotores como los inhibidores influyen en la germinación; si se induce un patrón a condiciones fotoperiódicas adecuadas, se podrá constatar como a menudo las patrones no inducidos inhiben la germinación. Estos efectos inhibitorios a menudo son ocasionados por influencia de la transferencia de los productos de asimilación metabólica (Rodríguez, 1972).

Desde el punto de vista fisiológico, se sabe que la circulación de iones puede ocurrir como parte de un sistema de transporte activo o en un sistema electrogénico o electrosmótico. Además, muchos elementos sufren circulación metabólica a través de la semilla. Ello resulta de su transporte inicial a la formación de tejidos foliares jóvenes en crecimiento activo. Conforme los tejidos maduran, los elementos son removidos de los tejidos donde se localizan originalmente y movilizados hacia los tejidos jóvenes que emergerán producto de la germinación (Frometa & Torres, 1980).

Ahora bien, cuando se aplica una diferencia de potencial sobre la membrana, los cationes la atravesarán bajo su influencia, transportando agua y moléculas de azúcar con ellas en envolturas de hidratación y mediante arrastre de solventes. El movimiento será en una sola dirección porque los aniones, al ser repelidos por las cargas de los poros, no los atravesarán; sólo los cationes se

movilizarán. Mediante tal sistema puede mantenerse un sustancial flujo de solutos. (Bidwell, 1979).

También tiene lugar la circulación del carbono; los compuestos orgánicos formados en la fotosíntesis se mueven hacia las raíces y cierta cantidad se combina químicamente con el amoníaco y retorna a los hojas o extremos en crecimiento como compuestos nitrogenados orgánicos (Hartmann & Kester, 1975).

Otros muchos factores específicos para cada especie influyen decisivamente en el proceso de germinación y desarrollo de las semillas. Aparte de los básicos: temperatura, luz y humedad, podemos señalar: el tipo y consistencia de las cubiertas, que a veces limitan fuertemente la hidratación de la semilla (proceso de imbibición), e incluso en casos extremos (*Rapidophyllum* sp.) impiden el intercambio gaseoso, retardando o impidiendo la germinación; y los reguladores de crecimiento (Giberelinas, Ácido Abscísico, Etileno, Auxinas y Citoquininas) cuya presencia-ausencia y concentración pueden promover o inhibir según la especie considerada la germinación de las semillas en condiciones naturales.

6.3 Aplicación de Termoterapia *in vitro*

Cuando se pretende desarrollar plantas bajo condiciones controladas como es el caso de una cámara de crecimiento, hay que tomar en consideración varios factores que son determinantes en el crecimiento de las plantas, sin embargo, los más importantes son: iluminación, temperatura y humedad relativa (Morris, 1956; Evans, 1959).

En el desarrollo de la presente investigación se optó por utilizar un programa de 1,600 lux de iluminación durante 16 horas diarias, esto como un factor que podía modificar la temperatura de la cámara junto al tipo de ventilación con que esta contaba (Joffe, 1962).

Como se pudo observar, este tipo de luz produjo muy poca o ninguna variación en la temperatura durante el tiempo que duró el experimento, lo cual confirma el criterio sostenido por otros autores de que este tipo de lámpara introduce poca energía calórica al interior de las cámaras de crecimiento (Leiser *et al.*, 1960), por lo tanto es de suponer que todo efecto significativo que indica variación en la humedad es introducido en la cámara por una mayor temperatura por efecto del uso del mayor número de tubos de luz blanca.

Lo anterior se fundamenta en los planteamientos hechos por Mc Farlane, (1978) quien sostiene que la luz es el elemento indispensable para el suministro de energía en varios procesos de las plantas; sin embargo la reacción de las plantas a la luz está determinada por el fotoperíodo, la intensidad y la calidad.

En una cámara de crecimiento el factor más fácilmente controlable es el fotoperíodo; en el caso de los cítricos los requerimientos son específicos y su comportamiento es el de una planta tropical, en la que a mayor número de horas de iluminación produce un mayor crecimiento total y el mejor crecimiento se obtiene con 16 horas de iluminación (Piringer *et al.*, 1961; Young, 1961).

La intensidad y la calidad de la luz también son susceptibles a ser controladas. La intensidad debe mantenerse dentro de ciertos límites que permitan un normal desarrollo de las plantas y la calidad debe estar dentro del espectro de luz que facilite un proceso normal fotosintético (Mc Farlane, 1978).

El suministro de luz en las cámaras de crecimiento se ha hecho normalmente con luz fluorescente (Hammer, 1963; Young, 1961) o una combinación de luz fluorescente e incandescente (Leiser *et al.*, 1960), y más recientemente con luz especial para el crecimiento de plantas (Herson, 1965; Pallas, 1964).

Las lámparas fluorescentes proveen un espectro de luz que es deficiente en el rojo y el infrarrojo para algunas plantas. Este problema se ha tratado de solucionar con la adición de luz blanca, la cual que provee una mayor longitud de onda en el espectro de absorción (Ies, 1972).

La creación de este tipo de luz especial para el crecimiento de plantas, trata de solucionar las deficiencias de las lámparas fluorescentes (Herson, 1965), al mismo tiempo trata de reducir la adición de color a las cámaras de crecimiento que introducen las lámparas incandescentes (Scott, 1967).

Por otro lado, la temperatura es el factor sobre el cual se debe ejercer mayor control en una cámara de crecimiento, porque afecta los procesos indispensables para el crecimiento de las plantas (Morris, 1957; Ormrood, 1978). El tipo de crecimiento y la forma como se desarrollan estos procesos es en función de los efectos de la temperatura en forma independiente sobre la fotosíntesis, transpiración, respiración, absorción de agua y minerales y la iniciación floral (Ormrood, 1978).

De acuerdo a nuestra experiencia, el empleo de un programa de 32⁰C aplicado a las varetas en las últimas fechas, confirma que durante la termoterapia, la temperatura con la cual se inician estos procesos varía de acuerdo con la especie, siempre que otros factores que influyen sobre el

crecimiento no sean limitantes, existiendo un mínimo, un óptimo y un máximo (Meyer *et al.*, 1960).

Por encima del máximo, un aumento de la temperatura produce dentro de la planta un decrecimiento en el funcionamiento de esos procesos, por debajo del mínimo se produce una paralización total (Evans, 1959).

Existen factores dentro de una cámara de crecimiento que pueden modificar la temperatura. La principal fuente de variación es el color producido por las lámparas (Herson, 1965). La introducción de luz blanca causa un mayor aumento de la temperatura por la adición de mayor cantidad de luz dentro del espectro de absorción (Ratan *et al.*, 1971; Scott, 1967).

Esto se ha solucionado en algunas cámaras, cuando la variación de la temperatura requerida debe ser mínima, mediante la utilización de filtros o barreras colocados entre la fuente de luz y las plantas (Barbee, 1973; Scott, 1967; Sweet & Tremor, 1978). Estos filtros son especialmente usados cuando se trabaja con intensidades lumínicas muy altas, y se ha sugerido que para asegurar una uniformidad en la variación de la temperatura ésta no debe ser mayor de 0.5°C, medida horizontalmente a intervalos de 10 cm. en una distancia de 1,30 m (Sweet & Tremor, 1978).

El color o el enfriamiento en el interior de una cámara de crecimiento aumenta con la variación de la ventilación, por lo que es recomendable mantener una baja circulación del aire, sin embargo, esto último da la posibilidad de que ocurran congelamientos en el equipo de enfriamiento, por lo que se ha sugerido 40 cambios de aire por hora para diferentes propósitos (Morris, 1957). Aunque diferentes cámaras de crecimiento usan diferentes ratas de ventilación (Calavan, 1978; Morris, 1957; Scott, 1967).

El establecimiento de un control preciso de la humedad relativa es difícil, y aún más difícil es mantener un nivel fijo por un largo periodo (Tibbitts, 1978).

Por estas razones muchas cámaras de crecimiento no tienen un control preciso de la humedad. Sin embargo, es recomendable mantener un control dentro de ciertos límites, de manera de evitar en el caso de un exceso, un ambiente favorable para el desarrollo de enfermedades, y en el caso de baja humedad, un estado de desecación en las plantas que cause un déficit de agua y en consecuencia limite el crecimiento (Barbee *et al.*, 1978; Hughes, 1959; Krizer *et al.*, 1971) .

Algunos autores recomiendan que el porcentaje de humedad relativa se mantenga entre 50-90%, pese a esto, parece ser que cada especie tiene un requerimiento específico en cuanto al porcentaje de humedad relativa que induce un mejor crecimiento o producción (Sweet & Tremor, 1978; Tibbitts, 1978).

Los cítricos dan una mejor producción y calidad fisiológica en condiciones de baja humedad relativa, como son las áreas mediterráneas (Reuter & Ríos Castaño, 1969), sin embargo, la combinación de altas temperaturas con alta humedad relativa induce mayor crecimiento vegetativo de los árboles (Bain, 1948).

6.4 Oxidación de los Patrones Microinjertados y Muerte de Meristemas

Villalobos & Torpe (1984) afirman que es importante considerar que la excisión del tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de tensión que altera su metabolismo celular y su balance de reguladores de crecimiento. También puede notarse a veces una coloración oscura en el fragmento de tejido vegetal y en el medio de cultivo, luego de la excisión. Esto se debe a la oxidación

de fenoles o polifenoles que se liberan cuando los tejidos sufren heridas (cortes), el explante deja de crecer y generalmente muere.

En la presente investigación, de acuerdo a los resultados de las diferentes fechas de evaluación, se notó que se obtuvo un elevado porcentaje de oxidación en forma rápida y progresiva conforme avanzaba el tiempo, existiendo en todos los casos un porcentaje de oxidación arriba del 50%, la cual significó un impedimento para el prendimiento del Microinjerto, dado que el ápice meristemático murió. Los datos obtenidos concuerdan con González *et al.*, (1977) quienes mencionan que la oxidación en las semillas de cítricos utilizadas como explantes, es bastante rápida.

Cuando se aísla el meristemo apical debe dañarse la región subdistal, ya que se inicia la formación de yemas si la incisión es profunda y daña el tejido provascular; si el tejido provascular no es dañado se inicia la formación de hojas, es así como los metabolitos necesarios para el crecimiento y desarrollo del meristemo apical pueden ser transportados a través del tejido provascular (Salisbury & Ross, 1994; Davies, 1995 y Gómez & Huaranca 1997).

Los promedios de oxidación que se obtuvieron oscilan entre 65% y 90%, coincidiendo con Hon-Ji (1984), quien trabajó con ápices y nudos cuyo porcentaje de ennegrecimiento fue progresivo y elevado durante la primera fase del experimento, encontrándose en promedio un 75% de oxidación. Al respecto Hurtado & Merino (1987) mencionan que la escisión del tejido de la planta provoca un estado de tensión que altera su metabolismo celular y su balance de reguladores de crecimiento, pudiendo notarse a veces una coloración oscura en el fragmento de tejido vegetal y en el medio de cultivo, luego de la escisión. Esto se debe a la oxidación de fenoles o polifenoles que se liberan cuando los tejidos sufren heridas (cortes), el explante deja de crecer y generalmente muere.

Con base en lo antes expuesto, Davies (1995), concluye que el meristemo apical exhibe una dependencia hormonal y nutricional por el tallo subyacente y primordios de hoja, además sufre una diferencia bioquímica que le impide producir ciertas sustancias esenciales para el crecimiento y mantenimiento de un meristemo determinado.

Por otro lado, Shabdé y Murashige citados por Tames (1992), demostraron la dependencia de fuentes hormonales de los meristemos apicales de clavel en hojas subyacentes y tejidos en tallo. Esto se debe a que cuando se inocula el domo meristemático en ausencia de primordios de hojas expandidas se deben incluir auxinas y citoquininas exógenas en el medio. En 1961 Jacobs citado por Azcon-Bieto & Talón (2000), mencionó que la síntesis máxima de auxinas se observó en el segundo par de primordios de hoja; sin embargo, la fuente de citoquininas se encuentra en el primer par de hojas expandidas.

Para la presente investigación y con base en los criterios antes mencionados, tratando de evitar que el meristemo entrara en un estado de tensión lo cual alteraría su metabolismo celular y su balance de reguladores de crecimiento se decidió usar, preliminarmente una solución desinfectante de baja concentración, siguiendo las recomendaciones de Khattak et al., (1990) para reducir la oxidación fenólica.

Los resultados de los porcentajes de patrones oxidados durante el microinjerto, demuestran que Citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) son los que obtuvieron mayor oxidación (89% y 90% respectivamente), contra un 87% de *C. volkameriana* y 65% de Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*). Esto se debe a la composición del medio nutritivo utilizado, en donde las sales del medio básico de Murashige & Skoog, en su concentración completa contribuyen a la oxidación de los

explantes, teniendo en cuenta lo mencionado por Krikorian (1991), quien sostiene que el ennegrecimiento de los explantes está estrechamente correlacionado con la utilización de las concentraciones más altas de medio básico (MS), que evidentemente resultan tóxicos.

6.5 Prendimiento del Microinjerto

Los análisis de las diferentes fechas de evaluación, muestran un promedio de prendimiento de los microinjertos exageradamente bajos, no coincidiendo con Navarro (1988) quien obtuvo entre el 30% y 60% de prendimiento al realizar microinjertos de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de cítricos libres de virus.

Por un lado, el medio básico (MS), juega un papel muy importante en el prendimiento y desarrollo del microinjerto, concordando con Pierik (1990) quien afirma que los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro* o *in vivo*, también indica que se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas o su fragmentos no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones.

Por otro lado, Strasburguer *et al.*, (1981) sostienen que los cotiledones constituyen un depósito nutritivo formado por un parénquima de reserva y esto se atribuye a la característica de la especie de ser poco exigente en sus requerimientos nutricionales, pero si con una marcada y diversa preferencia al medio líquido el cual determina su prendimiento.

El bajo porcentaje de prendimiento encontrado, está relacionado con los elevados porcentajes de oxidación existentes en el mismo, sumados a la dificultad que presentan las plantas leñosas para ser manipuladas *in vitro*, tal y

como lo mencionan Skirvin (1981) y Durán Rojas (1999), quienes sostienen que las plantas leñosas son muy difíciles de manipular *in vitro* y atribuyen que los fracasos en ciertas combinaciones de plantas son un testimonio de las diferencias existentes entre los injertos y los patrones., dado que existen combinaciones en las que el patrón no acepta en absoluto la yema introducida o lo hace a duras penas, aunque es evidente que puedan existir otras causas del fracaso no hay que excluir la posibilidad de incompatibilidad.

El problema de incompatibilidad asumió importancia en la fruticultura con el aumento de la demanda por nuevas variedades y portainjertos (Avilan, 1982).

Kohne (1992), define compatibilidad como la capacidad del injerto y el portainjerto para producir una unión exitosa que permite a la nueva planta compuesta, desarrollarse satisfactoriamente.

Cuando plantas semejantes son injertadas, se unen con facilidad y continúan creciendo como una planta única. Cuando son injertadas plantas que no tienen tales semejanzas, el resultado final es la falta de unión del injerto (Castle, 1982).

Entre esos dos extremos se observan una gama de resultados que son totalmente imprevisibles. Algunas combinaciones de portainjerto e injerto pueden crecer muy bien, pero el injerto recíproco fallar por completo. Ciertas combinaciones pueden crecer normalmente por unas pocas semanas o aún por varios años, pero después el injerto se seca o quiebra en el punto de unión. Algunas combinaciones se unen, pero luego aparecen síntomas de anormalidad, como crecimiento reducido, amarillamiento de hojas o

interrupción de tejidos en la unión del injerto. Plantas de estas combinaciones comúnmente duran algún tiempo y después mueren (Pliego-Alfaro, 1987).

Sriskandarajan (1982), afirma que la incompatibilidad puede presentar diferentes grados de intensidad, siendo esta, TOTAL cuando el injerto no prende, SERIA si la unión es muy débil y de escasa conexión vascular, lo que provoca muerte de plántulas en poco tiempo, MODERADA si la conexión es suficiente para mantener la vida de la planta, pero existe una gran debilidad general, UNIÓN POBRE DEL INJERTO, cuando pueden ocurrir desprendimientos con facilidad y finalmente LEVE cuando solo ocurre diferencia de crecimiento entre portainjerto e injerto y/o una disminución del vigor, que no afecta la sobrevivencia ni la eficiencia.

Las deformaciones en la unión del injerto que resultan de la incompatibilidad, generalmente pueden ser relacionadas con síntomas externos. Algunos de ellos han sido relacionados con combinaciones incompatibles tales como el desarrollo excesivo en la unión del injerto, arriba o abajo del punto de injerto (Adams & Rinne, 1980).

La ocurrencia aislada o combinada de uno o más de los síntomas mencionados, no significa necesariamente que la combinación sea incompatible. Algunos de esos síntomas pueden resultar también de determinadas condiciones ambientales desfavorables, como falta de agua o de algún nutriente esencial (Benech et al., 1991).

Millar *et al.*, (1937), después de revisar la literatura, afirmó que el porcentaje de prendimiento de combinaciones de injerto y portainjerto nunca antes testadas, no es necesariamente una indicación cierta de éxito o falla de la combinación durante toda la vida de las plantas.

George (1993), cita diversos casos de patrones que al ser injertados con ciertas variedades producen plantas muy buenas hasta un año de edad, sin embargo, en el año siguiente todas mueren, debido aparentemente a la "incompatibilidad retardada". El caso inverso también es encontrado en combinaciones que raramente producen más que un moderado número de uniones exitosas, pero que todas las plantas formadas tienen éxito posteriormente.

La incompatibilidad en el injerto fue clasificada por Pliego-Alfaro (1987) en Incompatibilidad Translocada e Incompatibilidad Localizada. La incompatibilidad translocada incluye aquellos casos en que la condición incompatible no es superada por la inserción de un injerto intermediario compatible con ambas partes, debido aparentemente a alguna sustancia hábil que puede moverse a través de él.

En las diversas modalidades de esta categoría, la gama de descomposición del tejido cortical se puede extender desde la falta de unión o la unión mecánicamente débil con tejidos deformados, hasta la unión fuerte con tejidos conectados en forma normal.

Según Weir (1976), este tipo de incompatibilidad se manifiesta por síntomas muy claros llevando a la muerte de la planta. Es probable que la indicación más clara de incompatibilidad sea la ruptura de la planta en el punto de unión, en particular después de haber crecido por algunos años, observándose una ruptura limpia y lisa. Esto puede ocurrir cuando las plantas alcanzan pleno desarrollo y están en producción.

La incompatibilidad localizada incluye combinaciones en que las reacciones de incompatibilidad aparentemente dependen del contacto mismo entre portainjerto e injerto. La separación de los componentes por la inserción de un portainjerto intermediario, mutuamente compatible, supera las manifestaciones de incompatibilidad. Con frecuencia, los síntomas externos se desarrollan con lentitud, apareciendo en proporción al grado de perturbación anatómica que existe en la unión del injerto, En el final, se presenta el agotamiento de las raíces debido a las dificultades de translocación a través de la unión defectuosa del injerto (Avilan *et al.*, 1983).

La diversidad de factores mencionados en la literatura relacionados con la incompatibilidad, indican la complejidad del problema. Algunas veces ocurre la falla inmediata de la unión, otras veces el injerto se une y ocurre la muerte del injerto en poco tiempo o, la incompatibilidad se puede manifestar solo después de varios años, ocasionando grandes perjuicios al productor por los elevados costos de implantación y manutención del monte.

Asimismo Krikorian (1991), menciona que existen muy pocos ejemplos sobre microinjertos de ápices que se hayan podido realizar con éxito.

En el mismo contexto, durante el desarrollo de esta investigación, se pudieron evidenciar algunos planteamientos hechos por Paiva y De Carvalho (1992), en donde se observó la influencia que el tamaño del explante (ápice meristemático) ejerce sobre el proceso de prendimiento *in vitro*; ya que mientras más pequeño es, presupone una mejor limpieza, pero aumenta su fragilidad al momento de pegarse al patrón, esto debido a factores determinantes como un sistema de conducción poco funcional, predisposición a estrés fisiológico, crecimiento bastante lento y poca disponibilidad a prendimiento *in vitro*.

Es a partir del momento del injerto cuando comienza el periodo crítico para el ápice injerto; solo cuando se forma tejido nuevo y las dos partes establecen una unión mediante los llamados puentes de parénquima, se posibilita el transporte de agua del patrón hacia el injerto (Forner, 1979).

6.6 Crecimiento (cm.) del Microinjerto

Los resultados muestran que se obtuvo un promedio de crecimiento de 1.3 cm. con un máximo de 2 cm., alcanzado por el Patrón Carrizo, no coincidiendo con Navarro (1979), quien obtuvo entre el 30% y 60% de prendimiento al realizar microinjertos de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de cítricos libres de virus; sin embargo, con esto se puede demostrar que los microinjertos son “normalmente” de crecimiento lento y solo basta un mínimo de concentración de sales para contribuir con su crecimiento y desarrollo.

Pierik (1990), haciendo una revisión del microinjerto en *Citrus*, señala que hasta la fecha los métodos de cultivo de ápices meristemáticos no han sido promisorios en cuanto crecimiento acelerado; esto debido al posterior crecimiento del eje caulinar en donde las zonas de inserción de las hojas sobre el tallo aparecen muchas veces engrosadas.

Velarde (1982) sostiene que las auxinas afectan al alargamiento del tallo, los coleóptilos son en extremo reactivos al AIA (Ácido Indolacético) y hay una fuerte correlación positiva entre la tasa de alargamiento del tallo de algunas plantas y la cantidad de AIA que contienen. Al quitar las hojas terminales, el crecimiento cesa, entonces se activa el AIA de la planta y entonces se reinicia el crecimiento de hojas; es en estas condiciones que el AIA es necesario para el alargamiento normal de los tejidos de la hoja del patrón-injerto.

La giberelina también afecta al crecimiento del tallo, pero de manera diferente. En tanto que la auxina causa alargamiento, primordialmente por causar alargamiento celular, las giberelinas lo estimulan tanto como la división celular.

Muchas plántulas obtenidas mediante microinjerto *in vitro* crecen tan altas como sus contrapartes normales con adición de Ácido Giberélico (Syvertsen, 1981).

Ya que tanto el AIA como el ácido giberélico afectan el desarrollo del tallo, surge naturalmente el problema de su interacción. Los tallos de plantas intactas, generalmente reaccionan al ácido giberélico pero no al AIA. Por otra parte, las porciones de tallo cortadas que reaccionan al AIA por lo general no son afectadas por el ácido giberélico. Pero cuando ambos productos se añaden simultáneamente a secciones de tallo, la reacción es mucho mayor que con AIA sólo (Minesy *et al.*, 1971).

La presencia de la auxina es necesaria para que la giberelina ejerza todo su efecto. También parece probable que la citocinina suministrada a las raíces es importante para estimular el crecimiento y la diferenciación en los tallos. De nuevo se enfatiza la importancia del balance entre las diferentes sustancias de crecimiento. Sin embargo, aún se está lejos de entender esta interacción en el control del crecimiento del tallo (Castle, 1978).

Ponpeu (1980), sostiene que además es necesaria la presencia de un azúcar para la inducción de crecimiento dado que la concentración de azúcar (1.5 a 2.5%) causa formación de xilema; la alta concentración (3 a 4%) causa formación del floema, y las concentraciones intermedias inducen por lo general xilema y floema con cambium entre ambos.

Los resultados de la presente investigación indican que la diferenciación de los tejidos vasculares, así como el diámetro del cilindro vascular están controlados por una interacción de AIA (Natural) y azúcares. Así, el agente de control se deriva del meristemo, pero los nutrientes interactuantes deben venir de la parte inferior. Parece probable que los efectos de la concentración de azúcar se asocien con la concentración de azúcar normal en el tejido vascular, siendo alta en el floema y baja en el xilema. De este modo, el floema es inducido por el floema pre-existente y el xilema por el xilema pre-existente según lo determina esa concentración.

Button & Kochba (1977), indican que es necesario tanto para la investigación como para la aplicación práctica del cultivo *in vitro*, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se puedan controlar luz, temperatura, humedad relativa, etc., los cuales son factores físicos que tienen mucha influencia en el crecimiento y desarrollo del microinjerto *in vitro*.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se mantuvo a los microinjertos en una cámara de cultivo con ambiente controlado que presentaba una temperatura promedio de 25°C., 70% de humedad relativa, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, tratando en lo posible de simular su hábitat natural.

6.7 Número de Hojas del Microinjerto

Los análisis realizados al final de la evaluación muestran que cuando se obtuvo un microinjerto exitoso; se observó un número promedio de brotación de 2 hojas, provenientes del ápice meristemático; para la presente investigación, dicho fenómeno se observó en el patrón Carrizo, siendo esto una evidencia del prendimiento y brotación del microinjerto, mientras que en los tres patrones restantes (Citrumelo, *C. volkameriana* y "Mandarina Cleopatra"), se pudo

observar la germinación de tres hojas provenientes del mismo patrón, siendo esto una clara evidencia de un microinjerto no exitoso.

Lo anterior se fundamenta en los aportes hechos por Schneider (1957) en donde sostiene que en el tejido primario es posible observar áreas localizadas del meristemo fundamental, fibras del procambium, protoxilema y protofloema afectados. En el tejido secundario del patrón, el cambium vascular es invadido, y algunas células cambiales y sus derivadas inmediatas se colorean y otras se hipertrofian, formándose una masa de células hipertrofiadas del parénquima con células cromáticas ocasionales en el lugar donde deberían formarse el xilema y el floema. En consecuencia, cuando se despega la corteza y el tejido anormal se desprende, se observa un desprendimiento directo del ápice meristemático injertado.

Por consiguiente, Durán Rojas (1999) afirma que los brotes terminales emergen con 3 o más hojas que se expanden casi de un modo simultáneo; el número de brotes y el número de hojas de cada brote depende básicamente de la edad y del vigor del patrón, se relacionan directamente con la longitud del tallo existiendo en algunos casos únicamente en la parte terminal de la planta, estando la parte media solo con nudos y brotes de primordios foliares, siendo a su vez poco vigorosos.

La actividad cambial se debe a un estímulo de auxinas y giberelinas producidas en las yemas en crecimiento. Si el patrón está en fase de reposo o crecimiento lento es más difícil la producción de cambium en el injerto. Cuando el patrón está hiperactivo (presión excesiva de las raíces) o hipoactivo, debe dejársele algún órgano por encima del injerto, que actúa de tirasavias (Ponpeu, 1980).

Además Engelbrecht & Schwerdtfeger (1979) sostienen que la tapa que se utiliza juega un papel determinante en la formación y desarrollo de hojas, pues condiciona el intercambio gaseoso y la entrada de luz los cuales inciden en el crecimiento y vigorosidad de las hojas recién emergidas.

El fisiólogo americano W.P. Jacobs encontró una relación muy estrecha entre la producción de auxina en las hojas y la reneación del xilema a una herida en la cicatrización en el tallo. También encontró una estrecha correlación respecto al tiempo entre la tasa de producción de AIA y la tasa de formación de elementos del xilema en las hojas jóvenes. Sus investigaciones lo llevaron a sugerir que la formación del xilema está afectada, de algún modo, por la doble influencia de la auxina que se mueve hacia abajo del tallo y de los nutrientes derivados de la fotosíntesis en las hojas que crecen hacia arriba (Castle & Phillips, 1980).

Teofilo Sobrinho (1972), afirma que durante el proceso de emergencia de hojas el alargamiento del tallo es un fenómeno complejo muy influenciado por los factores ambientales y controlado por las fitohormonas como se podría esperar, hay muchos patrones de desarrollo no tan sólo entre las diferentes plantas sino aun entre los diferentes entrenudos de una planta. No parece probable que haya diferencias cualitativas en la respuesta de las diferentes partes de una planta sino que serían diferencias cuantitativas en los niveles de los factores reguladores del desarrollo.

Finalmente, Pinedo *et al.*, (2001) sostienen que el crecimiento y desarrollo en un medio líquido resulta frecuentemente muy bueno, ya que las plantas sumergidas pueden absorber los nutrientes y reguladores por toda su superficie, mientras que en el medio sólido solo existe un contacto basal.

6.8 Color de Hojas del Microinjerto

Los análisis realizados final de la evaluación, muestran que el color verde claro de las hojas fue el que predominó como característica única de regeneración de hojas de microinjerto, contra color verde oscuro siendo estos los colores típicos de los patrones que regeneran, esto indica que existió una estrecha relación entre la asimilación de los nutrientes especialmente del nitrógeno y una buena captación de la luz favorecida por la utilización de tapas plásticas, concordando con los resultados de Engelbrecht & Schwerdtfeger (1979) y Gómez & Huaranca (1997), quienes sostienen que el tipo de tapas tiene influencia significativa para la vigorosidad, tamaño y pigmentación de las hojas.

El nitrógeno juega un papel importante en la coloración de las hojas de los microinjertos, por ser un constituyente que forma parte de la clorofila; de acuerdo a lo mencionado por Bidwell (1979), quien afirma que una planta bien nutrida de nitrógeno crece rápidamente, produce un amplio aparato asimilador y toma un color oscuro debido a la abundancia de clorofila. El déficit de nitrógeno en los vegetales se pone de manifiesto por la pérdida del característico color verde, sin embargo un exceso de nitrógeno produce succulencia de las hojas y tallos débiles. Se puede decir que el color verde en las hojas es un indicador de vitalidad de la planta.

7. CONCLUSIONES

1. Es posible realizar en condiciones de laboratorio, la técnica de Microinjertación *in vitro* de Ápices Meristemáticos de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss.) sobre los patrones de “Mandarina Cleopatra” (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.), *Citrus volkameriana*, Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*).
2. La aplicación de Termoterapia a las varetas de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss.) proporciona mejores resultados al ser programada en un rango de 32°C, dentro de la Cámara Versátil de Clima, las 24 horas del día, a 1,600 lux de iluminación por un período de 3 semanas, para procurar la germinación y desinfección viral *in vitro* de yemas.
3. Los patrones germinados de “Mandarina Cleopatra” (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.), *Citrus volkameriana*, Citrumelo CPB 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), después de un período de tres semanas, están listos para ser microinjertados obteniéndose prendimiento entre una o dos semanas después de haber sido injertados, estos presentan un crecimiento gradual que aumenta paulatinamente entre 5 y 10 mm. de longitud cada 2 semanas aproximadamente.
4. El patrón Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) rinde mejores resultados en el proceso de Desinfección y Germinación *in vitro*, siendo así, el patrón ideal para llevar a cabo la Microinjertación *in vitro* de Ápices Meristemáticos de Limón Pérsico (*Citrus latifolia* Bearss.).

5. En las fases experimentales en donde se evalúa el Prendimiento, Crecimiento y Desarrollo *in vitro* de los microinjertos, Carrizo (*Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*) ofrece la posibilidad de obtener mejores resultados, sin embargo, es importante seguir experimentando e implementando nuevas metodologías con aquellos patrones con los cuales no se obtengan microinjertos exitosos.
6. La oxidación de los microinjertos juega un papel muy importante para el éxito y prendimiento de ellos; considerándose a los cítricos como una especie leñosa en la que resulta difícil controlar la variable oxidación a pesar de usar una solución desinfectante de baja concentración.
7. Si el patrón está en fase de reposo o crecimiento lento es más difícil la producción de cambium en el injerto, por lo que el número de hojas germinadas en cada microinjerto depende básicamente de la edad y del vigor del patrón, relacionándose directamente con la longitud del tallo existiendo en algunos casos únicamente en la parte terminal de la planta, estando la parte media solo con nudos y brotes de primordios foliares.
8. Teniendo en cuenta la preferencia de hábitat que presentan los cítricos en su ambiente natural, se afirma que el medio de cultivo líquido favorece el prendimiento, crecimiento y desarrollo de los microinjertos, ya que las plantas sumergidas pueden absorber los nutrientes por toda su superficie teniendo a su vez una buena aireación.
9. La presencia de auxinas en el medio es necesaria para que la giberelinas ejerzan todo su efecto, se enfatiza la importancia del balance entre las diferentes sustancias de crecimiento y reguladores de crecimiento.

10. Es necesario tanto para la investigación como para la aplicación práctica de la Termoterapia y el Microinjerto *in vitro*, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se puedan controlar luz, temperatura y humedad relativa, dado que son factores físicos que tienen mucha influencia en el crecimiento y desarrollo de los microinjertos.

11. Al evaluar el desarrollo de las plántulas microinjertadas, se comprueba que la interacción entre las Técnicas de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos, representa una alternativa para el saneamiento de “Limón Pérsico” (*Citrus latifolia* Bearss.) a mediano y largo plazo en El Salvador.

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar la Microinjertación de patrones y yemas después de 3 semanas de haber obtenido la germinación *in vitro*, seleccionando los patrones con tallos rectos de 1.0 - 1.5 mm. de diámetro, para el caso de yemas injerteras, utilizar la yema terminal.
2. Las yemas que se injertarán deben manipularse cuidadosamente para disminuir el porcentaje de contaminación y oxidación de los microinjertos. El efecto determinante de estas variaciones sobre el fragmento aislado es considerable, pues la contaminación destruye los cultivos y el elevado porcentaje de oxidación del explante, inhibe el crecimiento.
3. Utilizar patrones trifoliados para facilitar la identificación y desarrollo de la unión entre patrón-portainjerto y microinjertos.
4. En el mismo contexto, se sugiere evidenciar algunos planteamientos hechos por diversos autores, en donde se enfatice la influencia que el tamaño del explante (ápice meristemático) ejerce sobre el proceso de prendimiento *in vitro*.
5. Se sugiere revisar otros trabajos sobre microinjerto, a fin de encontrar una relación muy estrecha entre la producción de auxina en las hojas y la renegación del xilema a una herida en la cicatrización en el tallo.
6. Establecer una correlación respecto al tiempo entre la tasa de producción de AIA y la tasa de formación de elementos del xilema en las hojas jóvenes, dado que la formación del xilema está afectada, de algún modo, por la doble influencia de la auxina que se mueve hacia abajo del tallo y

de los nutrientes derivados de la fotosíntesis en las hojas que crecen hacia arriba.

7. Determinar mediante un estudio de pregerminación, los mejores porcentajes de germinación en cada uno de los patrones a utilizar, para garantizar un excelente acoplamiento y posterior prendimiento entre los tejidos del ápice meristemático y el patrón-portainjerto.
8. Para posteriores ensayos estudiar un medio de cultivo más complejo para acelerar el crecimiento, formación de nudos y hojas del microinjerto.
9. Continuar con cada una de las fases del cultivo *in vitro* de microinjertos hasta sacarlos de condiciones de laboratorio, trasladarlos a aclimatación en invernadero y posteriormente a campo. Esto deberá de ser complementado con un tiempo de práctica más prolongado, de parte de la persona que lleve a cabo la Microinjertación.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour-Esquivel A. & J. V. Escalant. 1994. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica, 38 pp.
- Adams, C.A. & R. W. RINNE. 1980. Moisture Content as a Controlling Factor in Seed Development and Germination. *International Review of Cytology* 68: 1-8.
- Adkins, S. W. 1992. Cereal Callus Cultures. Control of Headspace Gases can Optimise The Conditions of Callus Proliferation . *Aust. J. Bot.* 40: 434-449.
- Alskief, J. 1978. La Micropropagation *in vitro* de Quelques Arbres Fruiteres. (Tesis de Doctorado) Université de Scinces et Techniques du Languedoc. Montpellier, Francia, 136 pp.
- Amorós, M. 1999. Producción de Agrios. 2ª Edición, Editorial Mundi-Prensa, Barcelona, España, 318 pp.
- Ascui, L. 1983. Utilización del Ápice Meristemático en la Micropropagación de Cítricos (*Citrus sinensis* L. Osbeck y *Citrus limon* L. Burm), (Tesis de Doctorado), Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 109 pp.
- Avilan, L. & L. Meneses; R. Sucre. 1983. Comportamiento del Sistema Radical del Patrón Cleopatra Injertado con Naranja 'Valencia' en Suelos de Textura Fina. *Agronomía Trop. (Ven.)* 33(16): 509-534.

- Avilan, L. & F. Leal; L. Meneses. 1982. Distribución del Sistema Radical de la Naranja Dulce (*Citrus sinensis*) y Grapefruit (*C. paradisi*) sobre Patrón Cajera (*C. aurantium*) en Suelos Calcáreos de la Hoya del Lago de Valencia. *Agronomía Trop. (Ven.)* 32(16):155-170.
- Azcon-Bieto, I. & M. Talón. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, 456 pp.
- Bajaj, Y. P. 1977. Clonal Multiplication and Cryopreservation of Cassava Through Tissue Culture. *Crop Improvement*, Cap. IV: pp 198-204.
- Bajwa, G. & S. Gurcharan; S. A. Singh; S. Khajuria; H.N. Khajuria. 1977. Rooting of Sweet Lime (*Citrus limettioides* Tanaka) Cutting as Affected by the Type of Cut and Indole Butyric Acid Concentrations. *Haryana J. Hort. Sci.* 6:115-116.
- Barba-Álvarez, A. 1987. *Reguladores de Crecimiento Vegetal. Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas, México DF, México, Cap. IV: pp 48-65.
- Barbee, D. G & s. P. Goplen, O. B; Thomas y C.E. Nucholls. 1973. A review categorizing engeneering design techniques of plants enviromental simulators. *J. Agric. Engng. Res.* 18:13-29.
- Batchelor, L. D. & B. P. Bitters. 1952. Two Promising Rootstocks for *Citrus* in California: Cleopatra Mandarin and Troyer Citrange. *Citrus Leaves*, University of California Press, 32 (7): pp 6-11.
- Batsford, B. T. 1993. *Flowering Plants of The World*. Batsford-Andromeda, London, England, 335 pp.

- Benech Arnold, R.L. & M. Fenner; P. J. Edwards. 1991. Changes in Germinability, ABA content and ABA Embryonic Sensitivity in Developing Seeds of *Shorgum bicolor* (L.) Moench Induced by Water Stress During Grain Filling. *New Phytologist* 118: 339-347.
- Beyer, E. & P. Morgan; F. Y. Shang. Ethylene. *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing Limited, United States of America, pp. 111-126.
- Bidwell, R. S. S. 1979. *Fisiología Vegetal*. AGT Editores, México DF, México, 700 pp.
- Bitters, W. P. & T. Murashige; T.S. Ragan; E. Nauer. 1972. Investigation on Establishing Virus Free Citrus Plants Through Citrus Culture. In Conference on International Organization Citrus Virologist. (5. 1972, Gainesville, Florida, EE.UU.). (Proceedings). Gainesville, Florida, EE.UU. s.n.p., pp 267-271.
- Brinks, T. 2000. *Application of Biotechnology in Selected Crops*. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Eschborn, Germany, 128 pp.
- Borges, L. & H. Morales; Z. Valero; S. León de S; R. Santos; C. Castro de R; A. del Villar. 1997. Comparación de Métodos de Esterilización Superficial de Yemas Apicales de "Mango" (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. En Resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas, Maracaibo, Venezuela, pp 102.
- Buchner, E. & T. Ramírez. 1994. Importancia de los Portainjertos en Cítricos y Enfermedades a Prevenir con Énfasis en Virosis. *Guía de Producción de Cítricos*. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, Honduras, 167 pp.

- Button, J. & J. Kochba. 1977. Tissue Culture in the *Citrus* Industry. In: Reinert, J. & Bajaj, Y.P.S. (Eds.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Berlin: Springer-Verlag, pp.70-92.
- Campbell, J. D. & H. C. Whelehel. 1962. Commercial Lime Production in Dade Country, Gainesville , University of Florida, Circular 237.
- Castle, W. S. & D. P. H. Tucker; A. H. Krezdorn; C. O. Yousey. 1993. Rootstocks for Florida Citrus. University of Florida, 231 pp.
- Castle, W. 1982. Commercial Citrus Rootstock in the United State. *Fruit Varieties Journal (EE.UU.)* 36 (3): 7479.
- Castle, W.; R. Phillips. 1980. Performance of 'Marsh' Grapefruit and 'Valencia' Orange Trees of Eighteen Rootstocks in a Closely Spaced Planting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci. (EE.UU.)* 105 (4): 496-499.
- Castle, W. 1978. Citrus Root Systems: Their Structure, Function, Growth, and Relationship to Tree Performance. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. p. 6269.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. Cultivo de Tejidos. En: *Informe Anual del Programa de Yuca, 1981*. Cali, Colombia, pp 115-126.
- Clark, M. & A. N. Adams. 1977. Characteristics of Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopath. Z.* 92: 332-337.
- Cornfort, J. W. & B. V. Milborrow; G. Ryback; K. Rothwell; R. L. Wain. 1966. Identification of the Yellow Lupin Inhibitor as (+)- abscisin II ((+)-dormin). *Nature*, 211: 742-743.

- Cuéllar-Zometa, J.M. 2002. Informe de Pasantía en IVIA, Valencia. Programa de Producción y Certificación de Semilla de Cítricos. Escuela Nacional de Agricultura "Roberto Quiñónez", Departamento de Biotecnología, San Andrés, La Libertad, El Salvador, 14 pp.
- Davies, P.J. 1995. Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers. London.
- De Andrade, R. & A. B. G. Martins. 2003. Propagación Vegetativa de Portainjertos para Cítricos. Revista Brasileira de Fruticultura, Vol. 25. No. I. Brasil, 57 pp.
- Devlin, R. M. 1980. Fisiología Vegetal. Editorial Omega, Barcelona, España, 442 pp.
- Dixon, R. A. 1987. Plant Cell Culture: A Practical Approach. Lrl-Press. Oxford, England, 236 pp.
- Durán Rojas, L. 1999. Los Cítricos y los Patrones Adecuados. Principios de Propagación de Plantas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía, Lima, Perú, 37 pp.
- Durán Vila, N. & P. Moreno. 2000. Enfermedades de los Cítricos. Sociedad Española de Fitopatología, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 165 pp.
- Engelbrecht, D. J. & U. Schwerdtfeger. 1979. *In vitro* Grafting of Grapevine Shoot Apices as an Aid to The Recovery of Virus-free Clones. Phytohylica, Sweden, Cap. XI: pp 183-185.

- Erickson, L. C. & W. P. Bitters. 1953. Effects of Various Plant Growth Regulators on Rooting of Cutting of *Citrus* and Related Species. Amer. Soc. Hort. Sci. Proceedings, United States of America, 61: pp 84-88.
- Esau, K. 1976. Anatomía Vegetal. Ediciones Omega, Barcelona, España, 478 pp.
- Evans, G. C. 1959. The design of equipment for producing accurate control of artificial aerial environments at low cost. J. Agric. Sc. 53: 198-208.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1999. Database Results. 48 pp.
- FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). 1994. Guía de Producción de Cítricos. Honduras, 167 pp.
- Flores-Vindas, E. M. 1998. Obtención de Plantas Libres de Virus. La Planta: Estructura y Función. 2ª Edición, Editorial Tecnológica de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, Cap. XIX: pp 464 - 470.
- Forner, J. 1979. Los Patrones de Agrios en España. Madrid, España, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Producción Vegetal No. 24. 31 p.
- Fontúrbel, R. F. 2001. Los Vitropatógenos: Consideraciones Generales, Detección y Eliminación. Journal of Virology, United States of America, 74 (23): 11073-11080.
- Frison, E. A. & M. M. Taher. 1991. FAO/IPGRI Technical Guidelines for The Safe Movement of Citrus Germplasm. Food and Agriculture Organization of The United Nations-International Board for Plan Genetic Resources, United States of America, 50 pp.

- Gautheret, R. J. 1992. History of Plant Tissue and Cell Culture a Personal Account in Cell Genetics of Plants. Academic Press, France, pp 2 -50.
- George, E.F., 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. I. The Technology. Exegetics Ltd., Edington, England, 348 PP.
- Giladi, L. & A. Altman; R. Goren. 1979. A Method for Aseptic Culture of Bud Explants from *Citrus* Trees. *Scientia Hort.*, 10: 7-12.
- Goldschmidt, E. E. & S. P. Monselise. 1968. Native Growth Inhibitors from *Citrus* Shoots Partition, Bioassay and Characterization. *Plant Physiology*, 43: pp 113-116.
- Gómez M. & R. Huaranca. 1997. Establecimiento *in vitro* de Propágulos de Camu Camu *Myrclaria dubia*. (H.B.K.) Mc.Vaugh. Tesis de Biología. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú. 43 pp.
- González, M. & I. Peña; J. González Rego; V. Zamora; I. Rodríguez. 1977. Introducción en Cuba del Injerto *in vitro* de Ápices de Brotes del Género *Citrus* y Géneros Afines Como una Forma de Obtener Plantas Libres de Virus. *Agrotecnia de Cuba*, 9: 61-71.
- Hammer, K. C. 1943. A chamber for growing plants under controlled conditions. *Bot. Gaz.* 105:437441.
- Henshaw, G. G. 1975. Technical Aspects of Tissue Culture Storage for Genetic Conservation. *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp 349-358.
- Hartmann, H.T. & E. E. Kester. 1975. *Plant Propagation*. Third Edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey, p. 549-551.

- Herson, V. A. 1965. Comparison of Gro-Lux and cool -white fluorescent lamps with and without incandescent as light sources used in plant growth rooms and development of tomato plants. *Can J. Plant Sci.* 45: 461-466.
- Hon-Ji, S. 1984. Modified Technique of Citrus Shoot-Tip Grafting and rapid Propagation Method to Obtain Citrus Budwood Free of Citrus Viruses and Likubin Organism. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. (In press).
- Hurtado, D. & M. Merino. 1987. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas, México DF, México, 232 pp.
- Ies. 1972. Micellaneous applications of radiant energy. p. 25 - 1-25-10. En: *IES lighting Handbook*. iluminating Engineering Society, New York.
- IBPGR (International Board For Plant Genetic Resources). 1983. Advisory Committee on *in vitro* Storage. Report of The First Meeting. Roma, Italia, 11 pp.
- Jonard, R. 1986. Microgarftin and Its Aplications to Tree Improvement, p 31-48. In: Y. P. S. Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol I, Springer-Verlag, Berlin.
- Jonard, R. & J. Hugard; J. J. Macheix; J. Martínez; L. Mosella; J. L. Poessel; P. Villemur. 1983. *In vitro* Micrografting and this Aplications to Ruit Science. *Scientia Horticulturae*, Montpellier, France, 20: pp 147-159.
- Jones, R. L. & T. A. Mansfield. 1970. Suppression of Stomatal Opening in Leaves Treated with Absciscic Acid. *J. Exp. United Kingdown, Bot*, 21: 714-719.
- Kadman, A. & E. Slor. 1974. Experiments with Propagation of Lychee (*Litchi chinensis*) in Israel, *Indian J. Hort.* 31: 28-33.

- Kartha, K. K. & O. L. Gamborg; F. Constabel; J. P. Shyluk. 1974. Regeneration of Cassava Plants from Shoot-Tip Apical Meristem. Sixth Symposium of the International Tropical Root Crops Society. Lima, Perú, Cap. II: pp 107-113.
- Katyal, S. L. Studies on seed formation, embryo development and pollen germination in Morton Citrange. Indian J. Hort., 6 (2): 21-30. 1949.
- Kawarada, A. & Y. Sumiki. 1959. The Occurrence of Gibberellin a in Wathershoots of *Citrus*. Bul. Agr. Chem. Soc. Japan, 23: pp 343-344.
- Khalifa, R. A. & L. N. Lewins; C. W. Goggins. 1963. New Natural Growth Promoting Substance in Young *Citrus* Fruits. Science, 142: pp 399-400.
- Khattak, M. S. & M. N. Malik; M. A. Khan. 1990. Effect of Surface Sterilization Agents on *in vitro* Culture of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Sufeda Tissue. Sarhad J. of Agric., 6: 151-154.
- Knapp, J. E. 1999. Florida Citrus Pest Management Guide. University of Florida, Gainesville, 156 pp.
- Kohne, J. S. 1992. Field Evaluation of "Hass" Avocado Grown on Duke-7, g6 and g755c Rootstocks. Proceedings in World Avocado Congress, Riverside, Usa. Pp. 301-303.
- Koziara, Z. 2001. Comparison of Methods for Disinfecting Seeds for *in vitro* Culture. Tissue of Agricell Report and Folia Horticulturae. University in Agriculture, Kraków, Poland, 12 (2): 79 – 91.

- Krikorian, A. D. 1991. Medios de Cultivo: Generalidades, Composición y Preparación. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. III: pp 41-76.
- Krikorian, A. D. 1991. Propagación Clonal *in vitro*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. V: pp 95-125.
- Krizer, O. T. & N. A. Bailey; H. H. Kluter. 1971. Effects of relativa humidity and type of container on growth of F I hybrid annuals in controlled environment. Amer. J. Bot. 58(6): 544-551.
- Kuan, C. J. & I. C. Ospina. 1990. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica, 86 pp.
- Kyte, L. & J. Kleyn. 1996. Plants From Test Tubes: A Introduction to Micropropagation. Third Edition, Timbers Press, United States of America, pp 113-136.
- Lamport, D.T.A. 1986. Roles for Peroxidase in Cell Wall Genesis, pp. 199-208. *In*: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar (eds.) University of Geneve, Geneve, Switzerland.
- Leal, F. 1969. Influencia de los métodos de almacenamiento sobre la viabilidad del Polen en Citrus y Poncirus. Rev. Fac. de Agronomía (Maracay) 5 (2): 5-28.
- Leiser, A. T. & A. C. Leopold; A. L. Shelley. 1960. Evaluations of light sources for plants growth. Plant Phys. 35 (3): 392-395.

- Leopold, C. A. & J. Kriedemann. 1975. Plant Growth and Development. McGraw-Hill Company. Second Edition. United States of America, 321 pp.
- Lindsey, K. & M. G. K. Jones. 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia S.A., España, 276 pp.
- Mabberley, D. J. 1997. The Plant Book. The Press Syndicate of the University of Cambridge, United Kingdom, 858 pp.
- Mc Farlane, J. C. 1978. A growth Chamber Manual. Environmental Control for Plants Cornell. Univ. Press london. Light, p. 15-44. En: R. W. LangLans (ed) 1978.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2000. Cultivo de Limón Pésico en El Salvador. Nueva San Salvador, 34 pp.
- Martínez, J. & J. Hugard; J. Jonard. 1979. Sur Les Diferentes Combinaisons de Greffages Dapex Réalisés *in vitro* Entre Pécher. C.R. Acad Sci. Paris, France, Cap. IIX: pp 759-762.
- Mendoza de Gyves, B. 1994. Agrobiotecnología. Grupo Editorial Iberoamericana. México DF, México, 79 pp.
- Merino, M. E. 1987. Medio de Cultivo. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México, Cap. V: pp 67-85.
- Miller, A. R. & D. L. Crawford; L. W. Roberts. 1985. Lignification and Xilogenesis in *Lactuca* pith Explants Cultured *in vitro* in the Presence of Auxin and Cytokinin: A role for Endogenous Ethylene. Journal Experimental Botany 36: 110-118.

- Minessy, F. & M. Barakat; E.L. Azab. 1971. Effect of Some Soil Properties on Root and Top Growth and Mineral Content of Washington Navel Orange and Balady Mandarin. *Plant and Soil (Netherlands)* 34 (1): 115.
- Monnier, M. 1974. Culture of Zygotic Embryos. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Department of Biology, Calgary University, Canada, pp 277-286.
- Monteverde, E. E. & R. Ramírez; H. Wiedenhofer; M. Espinoza; J. R. Ruíz; S. Albarrán. 1981. Efectos de la Fuente de Luz y una Lámina de Agua sobre la Temperatura y la Humedad Relativa en el Interior de una Cámara de Crecimiento Experimental. *Agronomía Trop. Maracay, Venezuela*, 31 (16): 115.
- Morel, G. 1975. Meristem Culture Techniques for The Long-Term Storage of Cultivated Plants. *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp 327-332.
- Morel, G.& C. Martin. 1952. Guerison de Dahlias Atteintes D'une Maladine a Virus. *C. R. Acad, Paris, France, D: 235*: pp 1324-1325.
- Morín, C. 1985. Cultivo de Cítricos. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica, 607 pp.
- Morris, L. G. 1957. Some Aspects of Control of Plant Environment. 11. The Control of Temperatura and Humidity in Artificially Iluminated Rooms. *J. Agric. I Eeng. Res.* 2 (1): 30-43.
- Morris, L. C. 1956. Some Aspects of Control of Plant Environments. *J. Agric. Eeng. Res.* 1(2): 156-166.

- Mosella, L. & L. Ascui. 1991. Frutales Libres de Virus Partiendo de Ápices Meristemáticos Cultivados *in vitro*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. XXIII: pp 513-532.
- Mosella, L. & L. Ascui. 1983. El Cultivo *in vitro* como Herramienta en la Investigación y Multiplicación de Plantas. Utilización de Ápices Meristemáticos en la Micropropagación de Cítricos. Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Agronomía, Chile, pp 54-60.
- Mosella, L. & M. Riedel; R. Jonard; P. Signoret. 1979. Développement *in vitro* D(Apex de Pecher (*Prunus persica* Batsch.): Possibilités D(Application. C.R. Acad. Sci. Paris, D: 1335-1338.
- Mullin, R. H. & D. F. Schlegel. 1976. Cold Storage Maintenance of Strawberry Meristems Plants. Horticultural Science, United States of America, 11: pp 1004.
- Murashige, T. & W. Bitters; T. Rangan; E. Naver; C. N. Roistacher; L. Holliday. 1972. A Technique of Shoot Apex Grafting and Its Utilization Towards Recovering Virus-Free Citrus Clones. Hort. Science, 7 (20): pp 118-120.
- Murashige, T. & D. P. H. Tucker. 1969. Growth Factors Requirements of Citrus Culture. In: International Symposium (1, Riverside, California, EE.UU.). (Proceedings). Riverside, California, United States of America, Cap III: pp 1155-1161.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant*, 15: 473-479.

- Navarro, L. 1992. Citrus Shoot-Tip Grafting in vitro. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Department of Tissue Culture, Moncada, Valencia, Spain, pp 327-338.
- Navarro, L. 1988. Application of Shoot Tip Grafting in vitro to Woody Species. *Acta Hortic.* 227: 43-55.
- Navarro, L. & J. Juárez; J. A. Pina; J. F. Ballester; J. M. Arregui. 1988. The Citrus Variety Improvement Program in Spain After 11 Years. In: Timmer, LW; Garnsey SM; Navarro, L. (eds) Proc 10th Conf Int Organization Citrus Virol, IOVC, Riverside, pp 400-406.
- Navarro, L. & J. Juárez; J. F. Ballester; J. A. Pina. 1980. Elimination of Some Citrus Pathogen Producing Psorosislike Symptoms by Shoot-Tip Grafting in vitro. In: Conference of International Organization Citrus Virologist. (8, Riverside, California, EE.UU.). (Proceedings). Riverside, California, United States of America, pp 162-165.
- Navarro, L. & J. Juárez. 1977. Elimination of Citrus Pathogens in Propagative Budwood. In vitro Propagation. *Proc. Soc. Citriculture*, 3: pp 973-978.
- Navarro, L. & C. N. Roistacher; T. Murashige. 1976. Effect of Size and Source of Shoot-Tip on Psorosis-A and Exocortis Content of Navel Orange Plants Obtained by Shoot-Tip Grafting in vitro. In: Calavan EC (ed). Proc. 7th Conf Int Organization Citrus Virol, IOVC, Riverside, pp 194-197.
- Navarro, L. & C. N. Roistacher; T. Murashige. 1975. Improvement of Shoot-Tip Grafting in vitro for Virus-free Citrus. *American Society Horticulture*, United States of America, 100 (5): pp 471-479.

- Nome, S. F. 1991. Pruebas de Detección de Virus, Viroides y Organismos Fitopatógenos Sistémicos Aplicadas al Cultivo de Tejidos. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. XXX; pp 663-695.
- Ormrood, D. P. 1978. A Growth Chamber Manual. Environmental control for plants. Temperature p. 45-56. En: R. W. Langhans (ed). Cornell Univ.Press, London.
- Ostapenko, V. I. 1958. An evaluation of different methods of determining pollen viability. Bjul nauc - tehn. Inform. Centr. Genet. Labor. im. I.V. Micurina N° 2: 3841 (Hors. Abst. 28: 2183. 1958).
- OIRSA (Organismo Internacional de Sanidad Agropecuaria). 2000. Manual Técnico de Buenas Prácticas de Cultivo para Limón Pérsico. Nueva San Salvador, El Salvador, 24 pp.
- Paiva, V. L. & S. A. de Carvalho. 1992. Citricultura Brasileira, 2ª. Edición, Fundación Cargill, Vol. 2, pp. 761-774.
- Peña, G. & R. Estrada. 1995. Microinjerto *in vitro* de la Chirimoya. Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología, FCB UNMSM, Perú, 1 pp.
- Pereira da Paz, B. & M. Pascual. 1998. Microenxertia. Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria & Centro Brasileiro Argentino de Biotecnología, Brasilia, Brasil, (1) 509: pp 147-157.
- Peters, P. 1993. Biotechnology. A guide to Genetic Engineering. McGraw-Hill Company. United States of America, 253 pp.

- Pierik R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa, España. 326 pp.
- Pinedo, M. 2001. Sistema de Producción de Camu Camu en Restinga. Programa de Ecosistemas Terrestres. I.I.A.P. Proyecto Bioexport - Camu camu. 141 pp.
- Pliego-Alfaro, F. & C. López-Encina; A. Barceló-Muñoz. 1987. Propagation of Avocado Rootstocks by Tissue Culture. South African Avocado Growers' Association Yearbook 10: 36-39.
- Pliego-Alfaro, F. & T. Murashige. 1988. Possible Rejuvenation of Adult Avocado by Graftage in to Juvenile Rootstocks *in vitro*. HortScience 22: 1321-1324.
- Ponpeu, J. 1980. Portaenxertos para Citrus. In Citricultura Brasileira. Coordinado por O. Rodríguez; F. Viegas. Campiñas, Bra., Fundación Cargill. V.I. pp. 281-286.
- Piringer, A. A. & R. J. Downs; H. A. Borthwick. 1961. Effects of Photoperiod and Kind of Supplemental Light on Growth of Three Species of Citrus and *Poncirus trifoliata*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 77:202-210.
- Pratt, R. 1958. Florida Guide in *Citrus* Insects, Diseases and Nutritional Disorders in Color. Agricultural Experiment Station, Gainesville, Florida, United States of America, 191 pp.
- Quak, F. 1977. Meristem Culture and Virus-Free Plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Spring-Verlag, Berlín, Germany, 615 pp.

- Quintero, W. & G. Mas y Rubí; R. Santos; S. León de S; C. Castro de R; B. Bracho. 1997. Efectos de la Temperatura y Tiempos de Inmersión en el Control de la Contaminación de Yemas Apicales de "Mango" (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, Cultivadas *in vitro*. En Resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas. Maracaibo, Venezuela, pp 101.
- Ratan, A. K. & B. Betteridge; G. L. Blackman. 1971. Interrelationships Between Nature of Light Source, Ambient air Temperature, and the Vegetative Growth of Different Species within Growth Cabinets. *Ann. Bot.* 35:323-343.
- Reuther, W. 1973. The Citrus Industry. Vol. 3. Production Tecnology. University of California, Division of Agricultural Sciences, 445 pp.
- Reuther, W. & D. Ríos Castaño. 1969. Comparation of Growth, Maturation and Composition of Citrus Fruit in Sub-tropical California and Tropical Colombia, p. 277-300. En: Proc. Intern, Citrus Symp. Vol 1. Univ. Cal. Div. Agric. Sci., Riverside California.
- Roca, W. M. & L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, 970 pp.
- Roca, W. M. & B. Nolt; G. Mafla; J. Roa; R. Reyes. 1991. Eliminación de Virus y Propagación de Clones en la "yuca" (*Manihot esculenta* Crantz). Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. XVII; pp 404-420.

- Rodríguez, O. 1972. Estudo do Espacamento, Portaenxerto e Adubaçao para a Laranjeira 'Baianinha' (*Citrus sinensis* (L) Osbeck). Tese. Piraçicaba, Bra., Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 81 p.
- Roistacher, C. N. 1977. Elimination of *Citrus* Pathogens in Propagative Budwood. I: Budwood Selection, Indexing and Thermoterapy. Proc. Int. Soc. Citriculture. Moncada, Valencia, Spain, 3: pp 965-972.
- Roistacher, C. N. & S. L. Kitto. 1977. Elimination of Additional Citrus Viruses by Shoot-Tip Grafting *in vitro*. Plant. Dis. Rptr. 61: 594 -596.
- Salisbury, F. B. & C. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Versión en Español Grupo Editorial Iberoamerica. Mexico. 875 pp.
- Saunt, J. 1990. Citrus Varieties of The World. Sinclair International Norwich, United Kingdown, 224 pp.
- Singh, S. N. 1961. Longevity of peach pollen. A. R. Hort Res. Inst. Saharanpur. 1961. pp. 3843 (Hors. Abst. 33: 429).
- Scott, K. R. 1967. Controled Temperature Cabinet with High Intensity Light for Studying Seed Germination. J. Agric. Engng. Res. 12(1): 75-82.
- Schilde-Rentschler, L. & W. M. Roca, 1987. Tissue Culture for The International Exchange of Potato and Cassava Germplasm. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlín, Germany, Vol. (3): pp 453-465.

- Schirawski, J. & A. Voyatzakis; B. Zacommer; F. Bernardi; A. Haenni. 2000. Identification and Functional Analysis of The Turnip Yellow Mosaic Tymovirus Subgenomic Promoter. *Journal of Virology*, 74 (23): pp 11073-11080.
- Skaria, M. & C. J. Kahike; N. Solis-Gracia; R. Prewett. 1997. Virus-free *Citrus* Budwood Production and Tristeza Management Program in Texas Trough Industry Partnership. *Sub Tropical Plant Science*, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, United States of America, 49: pp 1-7.
- Skaria, M. & N. Solis-Gracia; H. Miao. 1993. Occurrence of Citrus Tristeza Virus in South East Texas. *Pytopath.* 86: S 117 (abst.).
- Skirvin, R.M. 1981. Fruit Crops. In: *Cloning Agricultural Plants via in vitro Techniques*. Ed. By B.V. Conger. Boca Ratón, Fla., CRC Press. 51-139 pp.
- Starrantino, A. & Z. Guo; A. Caruso. 1986. Influenza di Alcuni Fitoregolatori Sull'attaccamento Dei Microinnesti Degli Agrumi. *Riv. Ortoflorofrutt.* In 70: 117-126.
- Strasburger, E. & F. Noll; N. Schenck; F.W. Schimper. 1981. *Tratado de Botánica*. Sexta Edición. Editorial Marín S.A. Barcelona - España. 776 pp.
- Sriskandarajan, S. & M. G. Mullins; Y. Nair. 1982. Induction of Adventitious Rooting *in vitro* in Difficult to Propagate Cultivars of Apple. *Plant Science Letters* 24: 1-9.
- Street, H. E. 1973. *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Sci. Publications, Oxford, England, pp 248-251.

- Surga J. G. 1988. Obtención de Plantas Libres del Virus del Mosaico del "Pepino" por Cultivo de Ápices Meristemáticos Aislados *in vitro* de dos cultivares de "Banano". Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Departamento de Frutales, Maracay, Venezuela, pp 62-72.
- Sussex, I. M. 1963. The Permanence of Meristems: Developmental Organizers or Reactors to Exogenous Stimuli. Brookhaven, Oxford, England, 16: pp 1-12.
- Syvertsen, J. 1981. Hydraulic Conductivity of Four Commercial Citrus Rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. (EE.UU.) 106 (3): 378-381.
- Sweet, H. C. & J. W. Tremor. 1978. Plant Growth Chamber on Space Lab: call for Scientific Input. Amer. J. Bot. 65(5): 594-600.
- Tames. 1992. Fisiología Vegetal. Editorial Pirámide. Madrid. 345 pp.
- Teofilo Sobrinho, O. 1972. Comportamiento de Lasanjeira Valencia (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) sobre diferentes Porta-enxertos. Tese. Piraçicaba, Bra., Escola Superior de Agronomia "Lui zde Queiroz". 82 p.
- Tibbitts, T. & W. 1978. A Growth Chamber Manual. Environment Control for Plants. Cornell. Univ. Press, London, New York.
- Timmer, L. W. & S. M. Garnsey; J. H. Graham. 2002. Plagas y Enfermedades de los Cítricos. 2ª Edición. The American Phytopathological Society, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 93 pp.
- Timmer, L. W. & L. W. Duncan. 1999. Citrus Health Management. American Phytopathological Society, United States of America, 127 pp.

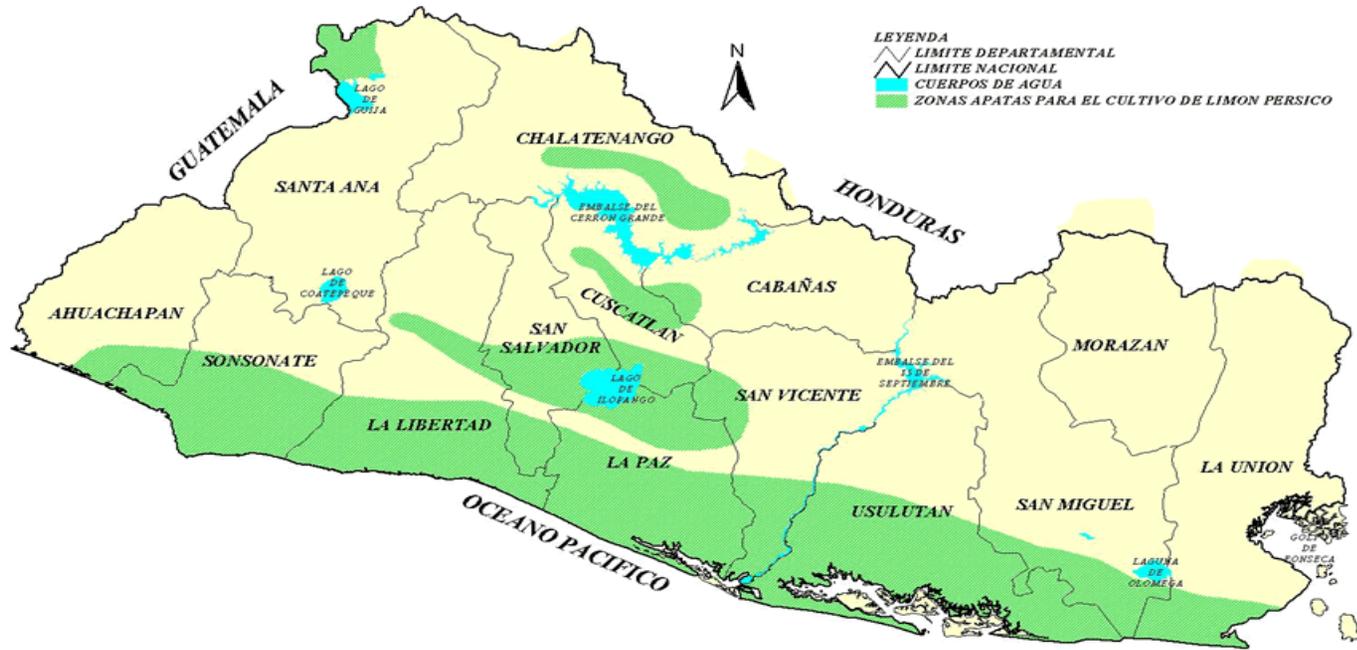
- Torres, C. & L. Caldas; A. Buso. 1998. Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria & Centro Brasileiro Argentino de Biotecnología. Brasilia, Brasil, (1-2): 864 pp.
- Tucker, D. P. H. & A. K. Alva; L. K. Jackson; T. A. Wheaton. 1995. Nutrition of Florida Citrus Trees. University of Florida. Coop, Ext, Serv, Publ, 169 pp.
- Vasil, I. K. 1958. A criticism of Baipai and Lal's paper entitled storage of experiments with pollens of cultivated fruit trees and vegetables. Sci. and Cult. 24: 233.
- Velarde, C. 1982. Adaptación y Comportamiento Vegetativo de 19 Patrones Cítricos en Venezuela. In Congreso Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas, Región Tropical (30., 1982, Caracas, Ven.). Resúmenes. Caracas, Ven., s n. s.p.
- VIFINEX (Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional). 2000. Principales Enfermedades de los Cítricos en El Salvador. 26 pp.
- Villalobos, V. & P. Ferreira; A. Mora. 1991. The Use of Biotechnology in The Conservation of Tropical Germplasm. Curso Internacional sobre Biotecnología Vegetal y su Aplicación a la Conservación y Uso de los Recursos Genéticos (24 abril - 05 mayo, 1995). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Cap. II: pp 197-215.

- Villalobos, V. M. & T. A. Torpe. 1984. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. VI; pp 127-141.
- Walkey, D. 1978. *In vitro* Methods for Viruses for Elimination, en *Frontiers of Plant Tissue Culture: Virus and Diseases*. Agriculture Handbook. United States of America, 232 pp.
- Weimer, R. C. 1998. Estadística. Segunda Edición, Compañía Editorial Continental, México DF, México, 839 pp.
- Weir, C. 1976. Effect of Various Rootstock on the Growth and Yield of "Valencia" Orange, March Seedles Grapefruit, and Ortanique Trees in Jamaica. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico (P. R.)* 60 (4): 485--490.
- Wetherell, D. F. 1983. Introduction to *in vitro* Propagation. *Aver's Plant Tissue Culture Series*. Wayne, New Yersey, United States of America, 161 pp.
- Whiteside, J. O. & S. M. Garnsey; L. W. Timmer. 1988. *Compendium of Citrus Diseases*. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minesota, 80 pp.
- Wilkins, M. B. 1984. *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing Limited, United States of America, 513 pp.
- Wiltbank, W. J. & A. H. Krezdorn. 1969. Determinations of Gibberellins in Ovaries and Young Fruits of Navel Oranges and their Correlation to Fruit Growth. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.* (94) 3: pp 195-200.

- Withers, L. A. & J. T. Williams. 1985. *In vitro* Conservation. IBPR Research Highlights. Roma, Italia, 265 pp.
- Withers, L. A. 1980. Tissue Culture Storage for Genetic Conservation. IBPR Technical Report. Roma, Italia, 357 pp.
- Withers, L. A. 1979. Freeze-Preservation of Somatic Embryos and Clonal Plantlets of *Daucus carota*. Plant Physiol. Roma, Italia, Cap. XII: pp 460.
- Young, R. H. 1961. Influences of Day Length, Light Intensity, and Temperature on Growth, Donnancy, and Cold Hardiness of Redblush Grapefruit Trees. Proc. Amer. Sco. Hort. Sci. 78:178- 180.
- Zaragoza, S. 1993. Pasado y Presente de la Citricultura Española. Serie de Divulgación Técnica, Generalitat Valenciana, 82 pp.
- Zuccherelli, G. 1979. Moltiplicazioni *in vitro* dei Portainnesti Clonali del Pesco. Frutticoltura, Roma, Italia, 41: 15-20.

APÉNDICES

**ZONAS APTAS PARA EL CULTIVO DE LIMON PERSICO
EL SALVADOR**



Apéndice 1. Zonas Aptas para El Cultivo de “Limón Pésico” en El Salvador. Fuente: Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador. Escala: 1: 1,000,000.



Apéndice 2. Vista Panorámica de las Instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de La Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez”.



Apéndice 3. Vista Panorámica de La Colección de Cítricos del Banco de Germoplasma propiedad del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA).

Apéndice 5. Hoja de Datos Utilizada para La Evaluación del Desarrollo *in vitro* de Varetas.

Título del Experimento:

“Evaluación de las Técnicas de Termoterapia y Microinjerto *in vitro* de Ápices Meristemáticos de ‘Limón Pérsico’ (*Citrus latifolia* Bearss.), sobre Diferentes Portainjertos en El Salvador”.

Fecha de Evaluación: _____ No. de Evaluación: _____

Número de Tubo	Contaminación (H) (B) (H y B)	Germinación (S) (N)	No. de Yemas Germinadas	Necrosamiento	Altura Aproximada (cm.)	Grosor Aproximado (cm.)	No Responde

H: Hongo, B: Bacteria

