

806

"ENSAYO DE LAS TECNICAS DE MICROINJERTACION DE YEMAS DE
NARANJO DULCE Citrus sinensis L. OSBECK EN MICROPATRONES DE
NARANJO AGRIO Citrus aurantium L.

TESIS

Sometida a la consideración de la
Escuela de Agricultura y Ganaderia

de la

Universidad de Sonora

por

Silvestre Barreras Valdez

Como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero Agrónomo con especialidad en Fitotecnia.

Octubre de 1990

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

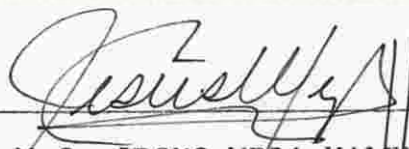
PAGINA DEL CONSEJO PARTICULAR

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Consejo Particular y aprobada y aceptada como requisito parcial - para la obtención del grado de :

INGENIERO AGRONOMO EN FITOTECNIA

CONSEJO PARTICULAR

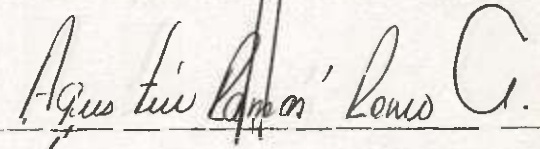
ASESOR


M.C. JESUS MEZA VALENZUELA

CONSEJERO


DR. JAIME JAVIER MARTINEZ TELLEZ

CONSEJERO


ING. AGUSTIN RAMON FCO. ROMO AYALA

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias:

A la Universidad de Sonora por haberme dado la oportunidad de estudiar y superarme.

A todo el personal del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora por su colaboración, especialmente a:

Jesús Meza Valenzuela y Gloria Irma Ayala Astorga.

A mis sinodales por la atención prestada y a todas aquellas personas que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres:

Por su cariño y enseñanzas que son para mi estímulo de superación, ya que a ellos debo la realización de mi carrera.

A mis hermanos, primos, tíos y abuelos:

Por su cariño y ayuda que siempre me han brindado.

Maestros y amigos:

Por su ayuda constante y por los momentos agradables que pasamos juntos.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE GRAFICAS	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCION	1
LITERATURA REVISADA	3
Obtención de plántulas patrón	4
Medios de cultivo para patrón	5
Plántulas-patrón	5
Obtención de yemas	6
Tamaño de las yemas a microinjertar	7
Tratamiento antes de la microinjertación	8
Factores que afectan el éxito de la microinjertación	8
Microinjertación	8
Medios de cultivo para material microinjertado	11
Mantenimiento del material microinjertado	12
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	27
CONCLUSIONES	32
RECOMENDACIONES	34
LITERATURA CITADA	35

LISTA DE TABLAS

	Página
1.- Composición del medio de Murashige y Skoog modificado, utilizado como medio base para la siembra de los micropatrones de cítricos.....	15
2.- Composición del medio de Murashige y Skoog modificado y suplementado, utilizado como medio base para establecimiento de las plántulas microinjertadas de cítricos.....	17
3.- Resultados obtenidos en microinjertación en "T"invertida en micropatrones obtenidos bajo condiciones de luminosidad ya diferentes edades del micropatrón.....	20
4.- Resultados obtenidos en microinjertación en "T"invertida en micropatrones obtenidos bajo condiciones de obscuridad y a diferentes edades del micropatrón.....	20
5.- Resultados obtenidos en microinjertación en la superficie decapitada del epicotilo, en micropatrones obtenidos bajo condiciones de luminosidad y a diferentes edades del micropatrón.....	21
6.- Resultados obtenidos en microinjertación en la superficie decapitada del epicotilo, en micropatrones obtenidos en condiciones de obscuridad y a diferentes edades del micropatrón.....	21
7.- Análisis de varianza y diferencia entre medias del porciento de brotación de yemas.....	22
8.- Análisis de varianza del porciento de yemas establecidas sin brotar.....	22

LISTA DE GRAFICAS

	Página
1.- Por ciento de brotación.....	23
2.- Por ciento de yemas establecidas sin brotar....	24
3.- Por ciento de aborción.....	25
4.- Por ciento de contaminación.....	26

RESUMEN

En el presente trabajo se buscaron las condiciones mas apropiadas para el establecimiento y desarrollo de las yemas resultante de el ensayo de las técnicas de microinjertación, lo cual es afectado por el medio de establecimiento de las plántulas patrón, la edad de dichas plántulas y el sitio de la microinjertación.

Se utilizaron yemas obtenidas directamente de ramas terminales de árboles jóvenes de campo; los micropatrones fueron obtenidos en constante obscuridad y bajo condiciones de iluminación con fotoperíodos de 16 horas luz y ocho horas de obscuridad, para ser utilizados al alcanzar edades de dos, tres, cuatro y cinco semanas.

Se probaron dos sitios de injertación: uno en "T" invertida a un costado del epicotilo decapitado y el otro en la superficie del epicotilo decapitado, con el fin de establecer el mejor sitio para el desarrollo de la yema. Se busca establecer la edad mas apropiada de los patrones para ser microinjertados y bajo cual de los dos medios de germinación y establecimiento se obtienen las plántulas mas apropiada para la microinjertación.

Se germinaron en el laboratorio semillas de naranjo agrio (*Citrus aurantium*, L.) para obtener plántulas patrón con el fin de utilizarlos en los ensayos de microinjertación con yemas de naranja dulce (*Citrus sinensis*, L. Osbeck) cultivar Valencia.

La siembra, desinfección, microinjertación y establecimiento ya sea de semillas o plántulas microinjertadas en el medio de cultivo, se realizaron en condiciones asépticas bajo, una cámara de flujo laminar.

Los mejores resultados obtenidos en porciento de brotación de yemas fueron: en plántulas de tres semanas germinadas en obscuridad e implantando las yemas en una incisión en T invertida. Y en el caso de plántulas de cinco semanas de edad es cuando se tiene el mas alto porcentaje de establecimiento de yemas sin brotación.

INTRODUCCION

En el Estado de Sonora, los cítricos ocupan el segundo lugar en los frutales cultivados comercialmente, se cuenta con más de 8,500 hectáreas, cuya producción asciende hasta 70,000 toneladas. A nivel regional, la zona comprendida por la Costa de Hermosillo es el principal productor de naranja con más del 50% de siembra de la superficie estatal, de ahí la gran importancia de esta región.

Las variedades de cítricos son propagadas asexualmente por injertación en patrones producidos por semilla, lo cual se puede lograr a nivel de micropropagación, utilizando las técnicas de cultivo de tejidos y la realización de la microinjertación.

La utilización del cultivo de tejidos como técnica de propagación asexual de plantas, se ha venido incrementando debido a la gran ventaja que ofrece en la micropropagación de especies sin depender del ciclo de vida de la planta, de las estaciones del año o de las condiciones climatológicas.

Muchos órganos de cítricos pueden crecer in vitro a diferencia de otros géneros leñosos. Consecuentemente, el cultivo de tejidos en cítricos, ha sido utilizado para investigar diferentes aspectos relacionados con la fisiología, patología y mejoramiento.

La técnica de injertación de yemas se ha utilizado para recuperar clones de cítricos de plantas enfermas con virus. Esta técnica descrita por Murashige en 1972,

consiste en injertar in vitro pequeñas yemas de ápices en el epicotilo decapitado de plántulas patrón.

Es factible la micromanipulación para injertar en el laboratorio variedades deseadas de naranjo y al mismo tiempo, contar con un stock de material vegetativo libre de virus para la micropropagación. Esta traería beneficios directos para la citricultura a nivel regional. Siendo de gran necesidad la investigación mas a fondo para lograr su desarrollo y su aplicación.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1.- Obtención de micropatrones in vitro, a partir de semillas de naranjo agrio Citrus aurantium L.
- 2.- Realizar ensayos de microinjertación con yemas de naranjo dulce Citrus sinensis L.Osbeck cultivar Valencia.

En 1959, Cochran plantea la forma de control mas fácil y efectiva y el logro de un stock de material vegetal libre de virus como fuente de yemas para la propagación.

En 1958, Camerón, Soots y Frost, señalaron la importancia de la embrionía nucelar en el género Citrus y géneros afines, en ese mismo año, al analizar los conocimientos sobre virus en este cultivo, los cuales rara vez son transmitidos por semilla, recomendaron la técnica de utilización de embriones nucleares, aunque señalándose que presentan algunas objeciones tales como la presencia de una gran cantidad de espinas, demora en entrar en producción y otras que denotan un retroceso indeseable a fases juveniles.

Siguiendo otra linea de investigación se han obtenido resultados positivos mediante el cultivo de tejidos, meristemos apicales para la obtención de plantas libres de virus, basándose en la baja concentración viral de los tejidos meristemáticos, en cuyas células se advierte además cierta resistencia a la infección (4).

La utilización de cultivo de tejidos como una técnica de propagación asexual de plantas, se ha venido incrementando debido a las ventajas que ofrece, haciendo posible la micropropagación de especies (3). La micropropagación es una de las técnicas que se aplican con buenos resultados en la multiplicación masiva de plantas anuales y bianuales, por otra parte en las especies perennes entre las que se

encuentran los frutales, no ha progresado al mismo ritmo,⁴ sin embargo, se han logrado buenos resultados con la aplicación de este método en diferentes especies, entre las cuales se encuentran los cítricos (12).

En 1972, Murashige y colaboradores reportaron un procedimiento en fase experimental, que sustituía el cultivo de tejidos, en este caso el ápice de un brote joven por el de inyección *in vitro* de un brote sobre una plántula patrón (4). En 1975, Navarro y colaboradores estudiaron esta técnica a detalle, algunas de las plantas obtenidas estaban libres de exocortis y no presentaban caracteres juveniles (9). En 1977, Calavan y Roistacher, proponen el método de microinjerto *in vitro* de Navarro y colaboradores como un programa de uso internacional para la eliminación de patógenos de cítricos (1, 4).

Obtención de plántulas patrón.

Las semillas son removidas del fruto, se lavan con agua corriente, se tratan con calor (sumergidas durante 10 minutos en agua a 52°C), se seca la superficie y se mantiene a temperatura ambiente por varias horas.

Cuando se usan semillas, se lavan (7), son peladas y puestas en pequeñas bolsitas de tela muy delgada en grupos de diez semillas, desinfectadas por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (blanqueador comercial diluido en proporción de 1:9 en agua+ 0.1% de tween 20 como agente humectante) durante diez minutos y enjuagando tres veces

5
con agua destilada estéril (8). Las semillas para la
obtención de patrones son sumergidas en ethanol al 95% y
remojadas por 5 segundos. La semilla es removida
asépticamente sembrada in vitro (2).

Algunas veces la esterilización de la semilla es
difícil y los contaminantes bacteriales crecen en el medio
de cultivo, esto pasa usualmente cuando las semillas son
almacenadas por un largo período de tiempo (un año o mas) o
cuando es almacenado incorrectamente, en este caso se
recomienda usar semilla fresca (8).

Medios de cultivo para patrón

Se siembran semillas en vermiculita húmeda estéril.
Haciendo una mezcla de 4.5 g de vermiculita finamente molida
y 25 mg de agua destilada deionizada en tubos de ensaye de
25 x 250 mm, los cuales se utilizan como medio de
germinación. Los tubos son tapados con tapones de acero
inoxidable y se esterilizan a 121°C durante 15 minutos,
se siembran tres semillas por tubo y la germinación se
lleva a cabo en oscuridad a 27°C (7).

Las semillas para obtención de patrones son sembradas
en solución de Murashige y Skoog (1962) solidificado con
agar al 1%. El pH del medio es ajustado a 5.7 antes de ser
esterilizado (9). El medio se distribuye en alícuotas de
25 ml en tubos de 25 x 150 mm, se siembra una semilla por
tubo y se pone a germinar a una temperatura de 27°C en
completa oscuridad por dos semanas (8, 9).

Para los citrangeros troyer y carrizo y para el citrumelo se utilizó el medio de Murashige y Skoog suplementado con 6-BAP (benzil-amino-purina) 1mg/l, AIB (ácido indol-butírico) 0.5 mg/l y adenina 40 mg/l (10).

Plántulas patrón.

Las plántulas obtenidas en constante obscuridad son comparadas con las obtenidas bajo condiciones de iluminación por 16 horas diarias con una intensidad de 1000 lux. Los patrones sembrados en la obscuridad se etiolan, siendo mas largos que los obtenidos bajo condiciones de iluminación pero les falta expansión de hojas (9). Las plántulas de cítricos tienden a producir crecimientos adventicios, particularmente en los sitios con heridas, por lo que es deseable que los patrones posean un distinto marcador morfológico. Citrange troyer, ha sido seleccionado como marcador por sus hojas trifoliadas, siendo este patrón el mas usado (7), tambien son utilizados como patrones: citrange carrizo *Poncirus trifoliata* L. Raf x *Citrus sinensis* L Osbeck, citrumelo sacatón *Poncirus trifoliata* L. Raf x *Citrus paradisi* Macf, limón *Citrus jambiri* Lush (8).

Obtención de yemas.

Para trabajos de rutina, las yemas se obtiene de crecimientos vegetativos, ya sea de: plantas de campo y/o de invernadero. Las plantas se defolian a mano para producir brotación en racimos en 10 a 20 días (8).

Algunas veces las yemas se obtienen de árboles de

campo con brotación natural, sin embargo, ordinariamente la disponibilidad de este material esta asociado con la estación, de tal manera que el material no siempre está disponible. Este inconveniente se cubre teniendo plantas en macetas en invernadero y defoliando las plantas enteras (9). Las yemas son obtenidas de: a) nuevos brotes en crecimiento activo, tanto en plantas de invernadero como de campo; b) de yemas axilares; y c) de brotaciones de yemas axilares crecidas bajo condiciones de cultivo in vitro (9). Hasta donde fue posible se tomaron las porciones terminales de 2-3 cm de crecimientos de árboles maduros. Se utilizan árboles infestados con virus como fuentes de yemas (7). La mejor fuente de yemas es la obtenida de brotes de plantas defoliadas en el campo o en el invernadero. También es posible utilizar yemas de brotaciones laterales cultivadas in vitro (9).

Tamaño de las yemas a microinjertar.

Cada ápice de yema se obtiene por disección bajo condiciones asépticas rigurosas bajo la observación del microscopio estereoscópico o de disección, con medidas de 0.1-0.5 mm (5). La yema apical disectada contiene: el domo del meristemo apical: el meristemo apical mas 2-3 primordios de hojas (9,11). Es necesario escoger el tamaño de yema que proporciona un porcentaje de éxito realista y que produce un razonable número de plantas libres de patógenos; el tamaño mas comunmente utilizado es de 0.1-0.2 mm (8).

Tratamientos antes de la microinjertación

Se efectúan pruebas de varias sustancias de crecimiento para remojar el epicotilo decapitado después de la decapitación pero antes de la injertación, remojando por 5 segundos en estas soluciones: 0, 0.01, 0.1, 1 mg/l de BA (benziladenina); 0 y 1 mg/l de IBA (ácido indolbutírico). Frecuentemente las yemas injertadas se mantienen vivas pero permanecen en estado de latencia aun después de tres meses, en estos casos, una gota de 20 mg/l de AG3 (giberelina), es aplicada a la yema para inducir su crecimiento (9).

El pretratamiento tanto de las yemas como de la porción disectada del patrón joven durante 10 minutos, en una solución de 6-BAP (benzil aminopurina) de 0.5 ppm, da un incremento de sobrevivencia en la microinjertación (2).

Sumergiendo el ápice en 2,4-D antes o después de injertar, duplica el porcentaje de éxito en injertos (8).

Factores que afectan el éxito de la microinjertación

El éxito de la microinjertación es influenciado por: la luz durante la germinación de la semilla, la edad del patrón, la variedad del patrón (8). La edad tal vez solo indica desarrollo de la plántula, la cual puede ser influenciada por: la temperatura, procedencia de la semilla, almacenamiento y desinfestación de la semilla. Las medidas más apropiadas para determinar la etapa óptima de desarrollo de la plántula para injertar son la altura y el diámetro del tallo. Rutinariamente se utilizaron plantulas de 3-5 cm de

9
alto y un diámetro de tallo de 1.6-1.8 mm a la altura del corte, estas medidas se alcanzaron entre 12-16 días (8, 11).

El tamaño de los ápices disectados, debe influenciar tanto en el éxito de injertación como en la exclusión de patógenos; desafortunadamente incrementando el tamaño de la yema se incrementa el éxito de injertación pero también la transmisión de enfermedades (7).

Los brotes de ápices se injertan in vitro sobre una plántula patrón libre de enfermedades obtenida in vitro. El éxito en la aplicación de esta técnica radica en el hecho de que las plántulas de cítricos son generalmente libres de virus y la suposición de que los brotes apicales son libres de patógenos (7).

Microinjertación.

El procedimiento descrito por Navarro para injertar diferentes especies en un patrón, es utilizado en la mayoría de los laboratorios, el cual comprende los siguientes pasos: preparación del patrón, preparación de la yema, microinjertación, cuidado de las plantas injertadas y transferencia al suelo (8).

Las plantas son extraídas de los tubos a las dos semanas después de la siembra y decapitadas bajo condiciones asépticas cortadas a 1.5 cm del epicotilo, la raíz es cortada de 4-6 cm, se eliminan los cotiledones y brotes axilares (8,9). La nueva plántula es microinjertada con la ayuda de un microscopio de disección en una cámara de flujo

laminar (11).

Los patrones son transferidos individualmente a cajas de petri estéril con papel filtro número 50 humedo y estéril el cual sirve para retardar la desecación de los tejidos durante la disección y la injertación. Las yemitas desinfectadas son puestas en otra caja de petri con papel filtro humedo (2).

Se investigan varios métodos del lugar de colocación de la yema en el patrón (9): la yema es puesta en el anillo vascular en la superficie del epicotilo decapitado o bien dentro de la incisión en "T" invertida en contacto con el cortex. Ambos tipos de injertación dan frecuencia similar de éxito; esta frecuencia aumenta con el tamaño de la yema pero el número de plantas libres de patógenos disminuye (8). La injertación hecha en "T" invertida tiene una incisión de una longitud de 1 mm en el corte vertical y de 1-2 mm en el corte horizontal (8, 9).

Una mayor limitación de las técnicas de injertación de yemas es el requerimiento de una excepcional destreza manual (7).

Las plantas obtenidas por microinjertación de yemas, las cuales eliminan virus, se ha observado que sobrepasan el estado juvenil (Murashige, 1972). Una aplicación exitosa de esta técnica depende del hecho de que las plántulas de cítricos están generalmente libres de virus y se asume porque la yema está libre de patógenos (2).

Medios de cultivo para material microinjertado.

Realizado el microinjerto, las plántulas se colocan en tubos de ensayo de 25 X 180 mm que contienen 25 ml de medio nutritivo líquido esterilizado en autoclave; los mismos se sostienen por medio de discos de espuma sintética a manera de flotadores, convenientemente perforados para dar paso a la raíz. se mantienen en solución desinfectante de hipoclorito de sodio hasta su utilización; antes de esto, se lavan tres veces con agua destilada estéril. Las características de este material no permite su desinfestación por altas temperaturas (1, 4).

El patrón injertado se colocado en un medio líquido de MS (Murashige y Skoog) suplementado con inositol en dosis de 100 mg/l, sacarosa 7.5%, tiamina-HCL 0.2 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, con plataformas de papel filtro Whatman número 4, las cuales son puestas en los tubos de cultivo de 15 X 150 mm y perforados en el centro para inserción del patrón. Los tubos de cultivo son tapados y sellados con parafilm para asegurar alta humedad relativa dentro del tubo (2, 11).

Se comparan los dos medios de cultivo: el de MS y el de Hoagland no habiendo diferencia entre ellos. Estos medios también contienen 100 mg/l de inositol, 4% de sacarosa, 0.2 mg/l de tiamina-HCl, 1 mg/l de piridoxina, 1 mg/l de ácido nicotínico, se ajusta el pH a 5.7 antes de esterilizar. El medio es distribuido en alícuotas de 25 ml utilizando papel filtro número 50 como soporte puesto en la superficie de la

solución, se perfora la plataforma en el centro, se tapan con tapones y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se mejora la formulación de nutrientes adicionándole las siguientes sustancias: N6-benziladenina en dosis de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10.1 mg/l; ácido indolacético en dosis de 0, 0.01, 0.1, 1 y 10.1 mg/l; sacarosa en dosis de 0, 2.5, 5, 7.5 y 10%; vitaminas como la tiamina-HCl, piridoxina, ácido nicotínico en dosis de 0, 1, 3 y 10 veces su concentración inicial (9).

Mantenimiento del material microinjertado.

Las plantas injertadas se mantienen a 16 horas diarias de luz con una intensidad de 1000 lux, a una temperatura constante de 27 °C. Se hacen las pruebas de variación de intensidad de 0, 300, 1000, 3000 y 10000 lux; las plantas son observadas periódicamente utilizando el microscopio de disección, se eliminan raíces adventicias asépticamente utilizando tijeras. a intervalos de un mes los cultivos que muestran éxito en la microinjertación son transferidos a tubos con nutrientes frescos para mantener el crecimiento vigoroso (9).

Las plantas se tienen durante esta fase bajo las condiciones siguientes: temperatura promedio de 28 °C, humedad relativa promedio 70% y la iluminación brindada por cuatro lámparas fluorescentes de 20 W durante 16 horas diarias colocadas a 55 cm de altura sobre las mismas (4).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS) de octubre de 1989 a junio de 1990. El diseño utilizado es el de un Completamente al azar con tres repeticiones. Los datos a tomar fueron porcentos de: brotación; yemas establecidas sin crecimiento; aborción; y contaminación. Tomados en: dos tipos de microinjertación ("T" invertida y en la superficie del epicotilo decapitado); edad de la plantula patrón (de dos a cinco semanas); y medio de obtención del patrón (obscuridad y luminosidad).

Se recolectaron frutos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) los cuales se seleccionaron en base a características deseables de plantas sanas y vigorosas; se extrajeron sus semillas con características deseables, eliminando aquellas que estaban dañadas o mal formadas; se lavaron varias veces con agua corriente eliminándose sus dos tegumentos. Las semillas una vez peladas se colocaron en hojas de papel que se utilizan para limpieza de lentes de microscopio (lens tissue Hamilton, Bell Co. Inc.), formando bolsitas con diez semillas que son atadas con ligas para pasar por un tratamiento de desinfestación en agua clorada al 10% (en relación 1:9), al que se le agregan tres gotas de tween 20 al 0.1% como agente humectante, donde se sumergieron por 10 minutos, se enjuagaron tres veces con

agua destilada estéril. El material de vidrio y los instrumentos se esterilizaron en autoclave a 121°C con 15 libras de presión durante 15 minutos. El material metálico se mantuvo en alcohol etílico al 90% y también se flameó al estar utilizando. El ambiente estéril se logró mediante el uso de una cámara de flujo laminar. La siembra se llevó a cabo, colocando una semilla en cada tubo de ensayo inclinado a 30° en un medio que contenía 4.3 g/l de sales minerales de Murashige y Skoog (tabla 1), ajustando el pH a 5.7 ± 0.1 utilizando para ello NaOH 1N o HCl 1N, para solidificar el medio se le agrega 8.5 g/l de agar y se esteriliza el medio, una vez realizada la siembra se llevó a incubación a 27°C bajo dos condiciones diferentes: completa oscuridad e iluminación con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Las plántulas obtenidas bajo estas dos condiciones, fueron utilizadas como patrón al alcanzar edades de 2, 3, 4 y 5 semanas, para ser microinjertadas.

Las yemas fueron obtenidas directamente de brotes jóvenes de 15-20 cm de longitud, de plantas aparentemente libres de virus de naranja dulce cultivar Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck), del Campo San Carlos de la Costa de Mermosillo. Las yemas colocadas en hojas de papel, se desinfectaron en alcohol al 70% durante un minuto para de ahí pasar a una solución de agua clorada al 10% con tres gotas de tween 20 al 0.1% por 10 minutos y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril, pasando a una caja petri para de ahí ser microinjertada en el patrón.

Tabla 1.- Composición del medio de Murashige y Skoog modificado, utilizado como medio base para la siembra de los micropatrones de cítricos.

I. Sales inorgánicas:

Macroelementos	concentraciones mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.0
FeSO ₄	27.3
KH ₂ PO ₄	170.0
KNO ₃	1900.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.0
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
NH ₄ NO ₃	1650.0
Microelementos	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.63
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	6.6

II. Sustancias orgánicas.

Inositol	100.0
Tiamina-HCl	0.4
Hidrolizado de caseína	100.0

Fuente: Murashige, 1962.

Las plántulas patrón una vez germinadas y que han alcanzado la edad correspondiente a su tratamiento, se extrajeron del tubo y se decapitó su epicotilo a 1-1.5 cm por arriba de los cotiledones, se eliminaron estos y la punta de la raíz a una distancia de 5-6 cm de los cotiledones; el injerto se realizó con ayuda del microscopio de disección y en condiciones asépticas. La yema se preparó previamente removiendo sus primordios foliares mas grandes con el fin de obtener el meristemo apical con 2-3 primordios de hojas mas pequeñas unidos a la yema. Estando en este momento yema y patrón listos para ser microinjertados.

Se probaron dos métodos de colocación de la yema en el patrón: el primero consistió en colocar la yema en la parte superior del epicotilo decapitado, tratando que la base de la yema quede en contacto total con la superficie del patrón; el segundo consistió en colocar la yema en una incisión en T invertida a un costado del epicotilo decapitado, procurando pasar con el corte hasta el anillo vascular.

El tiempo para realizar estas operaciones, debe ser el mínimo para evitar una deshidratación de la yema y del patrón.

Una vez realizado el microinjerto, las plántulas se colocaron en tubos de ensaye conteniendo el medio de Murashige y Skoog suplementado (tabla 2). Se ajustó su pH a 5.7 + 0.1 y se agrego 7 g/l de agar para semisolidificar el medio, pasando a esterilización. Una vez colocadas las

TABLA 2.- Composicion del medio de Murashige y Skoog, modificado y suplementado, utilizado como medio base para establecimiento de las plántulas micro-injertadas de citricos.

Substancias	Concentraciones
Sales de M S	5 g/l
Sacarosa	30 g/l
Agar	7 g/l
Inositol	5 ml/l
Tiamina	1 ml/l
Piridoxina	1 ml/l
Ac. nicotínico	1 ml/l

plántulas microinjertadas dentro de los tubos de ensaye, pasan al cuarto de incubación a una temperatura de 27oC con fotoperiodos de 16 horas luz y 8 horas de obscuridad, por un periodo de observación de cuatro semanas, eliminando el material contaminado.

En este trabajo se probaron el porciento de brotación y el porciento de establecimiento de yemas sin brotar en: dos sitios de microinjertación (T invertida y en la superficie del epicotilo decapitado); edad de la plántula patrón; y medio de obtención del patrón (obscuridad y luminosidad).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas: 3,4,5,6,7 y 8, de las cuales las primeras cuatro pertenecen a la serie de datos que se fueron tomando a través del desarrollo del experimento. No todos los resultados son presentados, ya que al inicio se efectuaron una serie de ensayos que tuvieron muy bajo establecimiento, sin embargo fueron básicos para la obtención de los ensayos de microinjertación y sirvieron para la afinación de técnicas. En las dos últimas tablas se presentan los análisis de los datos de mayor relevancia para esta experimentación y que nos dan una idea mas clara de los resultados obtenidos.

El significado de cada una de las columnas incluidas en las tablas que se presentan es el siguiente:

- I.- Semanas a injertación.
- II.- Semanas a toma de datos.
- III.- Porciento de yemas verdes sin brotar.
- IV.- Porciento de yemas amarillas sin brotar.
- V.- Brotación (%).
- VI.- Yemas semidesprendidas (%).
- VII.- Total de yemas establecidas.
- VIII.- Yemas desprendidas(%).
- IX.- Contaminación(%).

VII

TABLA 3.- Resultados obtenidos en microinjertación en T invertida, en micropatrones obtenidos bajo condiciones de luminosidad y a diferentes edades del micropatrón. 20

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
3	1	40.0	10.0	0.0	30.0	80.0	20.0	0.0
	2	40.0	0.0	40.0	0.0	80.0	20.0	0.0
	3	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	20.0	30.0
4	1	55.5	0.0	8.1	27.3	90.9	8.1	0.0
	2	55.5	0.0	44.5	0.0	100.0	0.0	0.0
	3	55.5	0.0	44.5	0.0	100.0	0.0	0.0
5	1	30.0	0.0	0.0	0.0	30.0	0.0	70.0
	2	20.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	80.0
	3	20.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	80.0

TABLA 4.- Resultados obtenidos en microinjertación en T invertida, en micropatrones obtenidos bajo condiciones de obscuridad y a diferentes edades del micropatrón.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
2	1	40.0	40.0	0.0	10.0	90.0	0.0	10.0
	2	20.0	10.0	20.0	40.0	90.0	0.0	0.0
	3	0.0	0.0	40.0	0.0	40.0	50.0	10.0
3	1	57.1	0.0	42.9	0.0	100.0	0.0	0.0
	2	42.8	0.0	42.9	0.0	85.7	14.3	0.0
	3	28.6	0.0	57.1	0.0	85.7	14.3	0.0
4	1	60.0	0.0	0.0	40.0	100.0	0.0	0.0
	2	50.0	0.0	50.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	3	40.0	0.0	60.0	0.0	100.0	0.0	0.0
5	1	50.0	50.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	2	0.0	90.0	10.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	3	0.0	60.0	20.0	0.0	100.0	0.0	0.0

TABLA 5.- Resultados obtenidos en microinjertación en la superficie decapitada del epicotilo, en patrones obtenidos bajo condiciones de luminosidad y a diferentes edades del micropatrón.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
2	1	33.3	0.0	13.3	6.7	53.3	46.7	0.0
	2	33.3	0.0	13.3	6.7	53.3	46.7	0.0
	3	33.3	0.0	13.3	6.7	53.3	46.7	0.0
3	1	60.0	0.0	0.0	30.0	30.0	10.0	0.0
	2	0.0	0.0	30.0	0.0	30.0	30.0	40.0
	3	0.0	0.0	30.0	0.0	30.0	30.0	40.0
4	1	77.8	0.0	0.0	22.2	100.0	0.0	0.0
	2	44.5	11.1	0.0	44.4	100.0	0.0	0.0
	3	55.6	0.0	0.0	0.0	55.6	0.0	44.4
5	1	28.6	0.0	0.0	0.0	28.6	71.4	0.0
	2	28.6	0.0	0.0	0.0	28.6	71.4	0.0
	3	28.6	0.0	0.0	0.0	28.6	71.4	0.0

TABLA 6.- Resultados obtenidos en microinjertación en la superficie decapitada del epicotilo, en patrones obtenidos bajo condiciones de obscuridad.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
2	1	20.0	0.0	0.0	40.0	60.0	10.0	30.0
	2	50.0	0.0	0.0	10.0	60.0	10.0	30.0
	3	20.0	0.0	0.0	30.0	50.0	20.0	30.0
3	1	42.9	0.0	0.0	14.2	57.1	42.9	0.0
	2	0.0	0.0	0.0	57.1	57.1	42.9	0.0
	3	57.1	0.0	0.0	0.0	57.1	42.9	0.0
4	1	70.0	0.0	0.0	0.0	70.0	30.0	0.0
	2	70.0	0.0	0.0	0.0	70.0	30.0	0.0
	3	80.0	10.0	0.0	0.0	70.0	30.0	0.0
5	1	14.3	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	85.7
	2	14.3	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	85.7
	3	14.3	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	85.7

TABLA 7.- Análisis de varianza y diferencia entre medias del porcentaje de brotación de yemas.

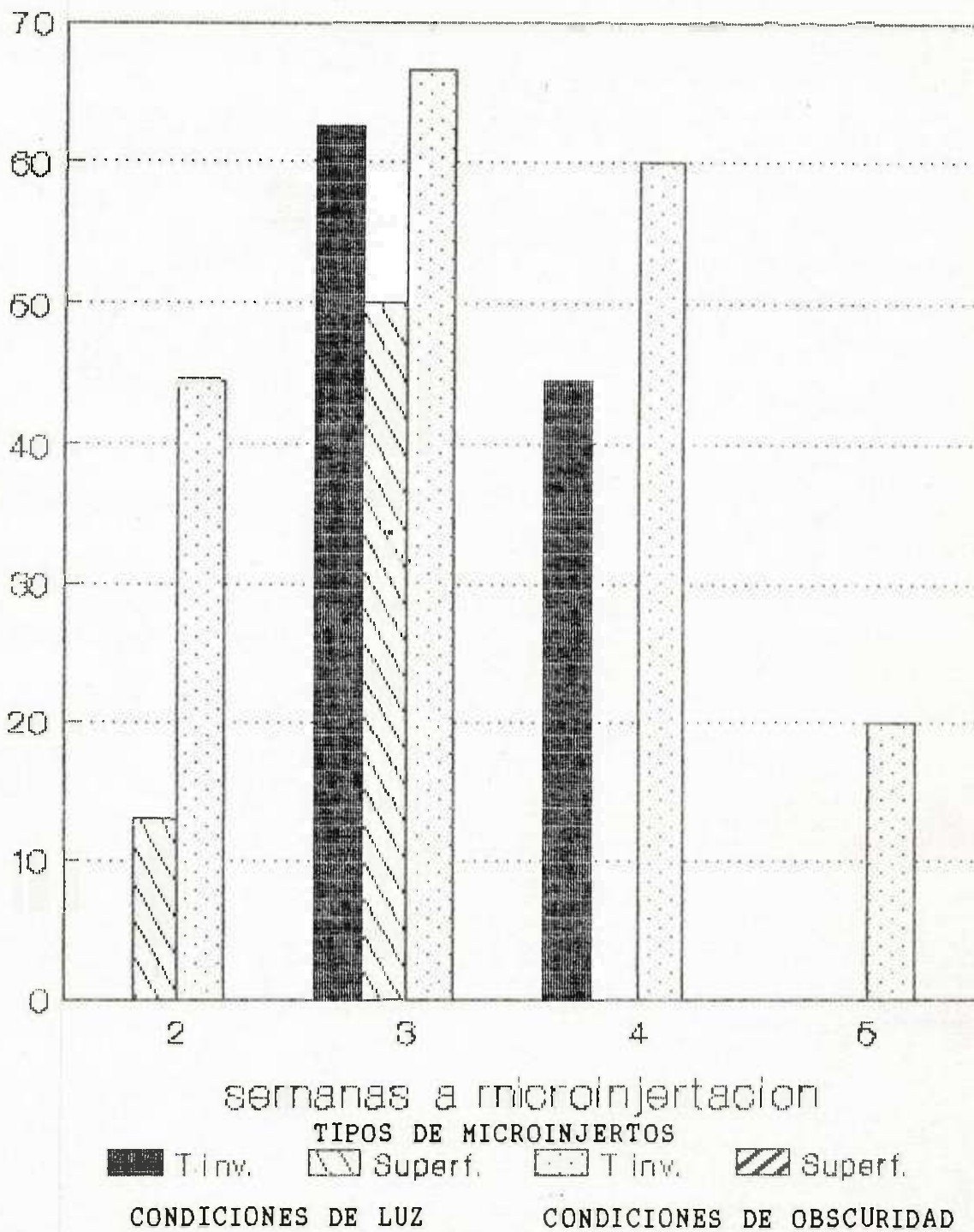
Edad del patrón (sem.)	broT.(%)	tipos de microinj.	broT(%)	Medios de germinar	broT(%)
4	49.9 a	T invert.	42.8 a	Obscuridad	41.0 a
3	49.7 a	Superficie	25.3 b	Luz	30.8 b
2	19.4 b				
5	15.0 b				
X	33.7		33.5		35.9
C.V.	22.8%		26.9%		34.4%
DE	4.4		5.2		7.1
Fc	14.7**		8.1*		1.0NS
DMS	6.6		7.4		10.1

TABLA 8.- Análisis de varianza y diferencia entre medias del porcentaje de yemas establecidas sin brotación.

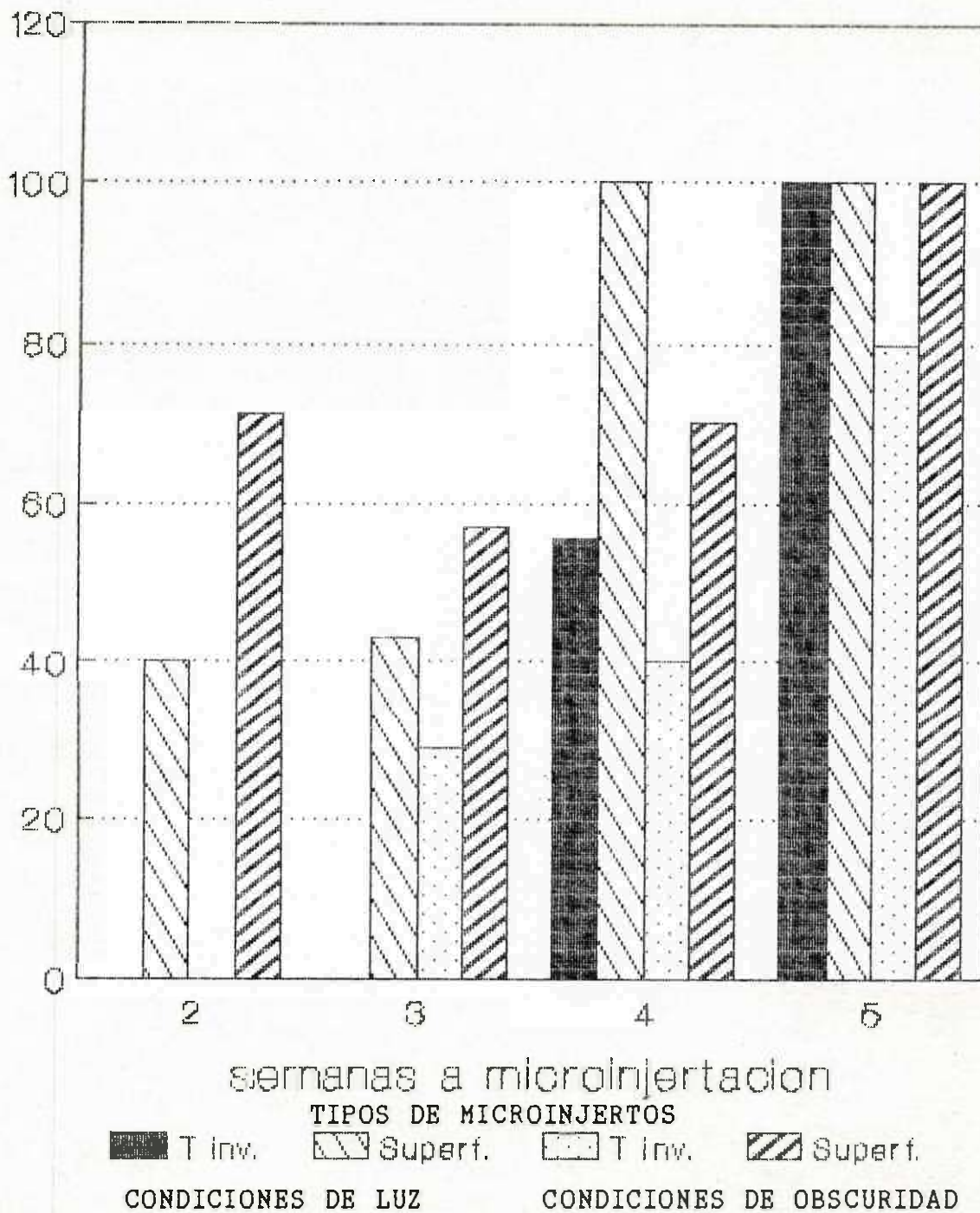
Edad del patrón. (sem.)	broT(%)	Tipos de microinj.	broT(%)	Medios de germinar	broT(%)
5	97.5 a	Superficie	75.8 a	Luz	73.4
4	74.5 b	T invert.	71.6 a	Obscuridad	73.1
2	66.3 b				
3	53.3 c				
X	72.9		73.7		73.3
C.V.	15.1%		13.6%		14.4%
DE	6.4		5.8		8.6
Fc	8.5**		0.3NS		0.001NS
DMS	9.5		8.2		7.7

** diferencia altamente significativa
 * diferencia significativa
 NS no hay diferencia entre tratamientos

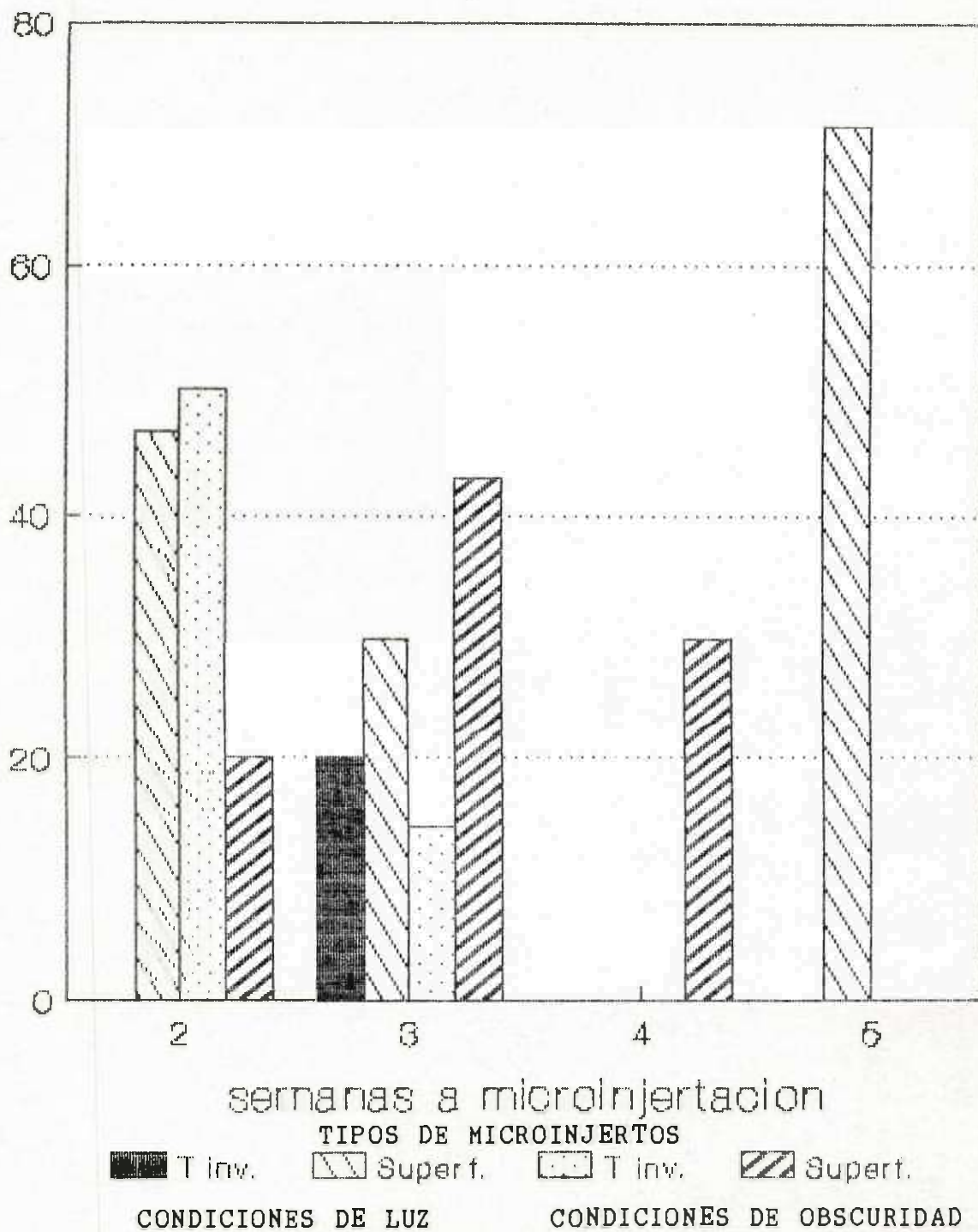
Gráfica 1- Porcentaje de brotación



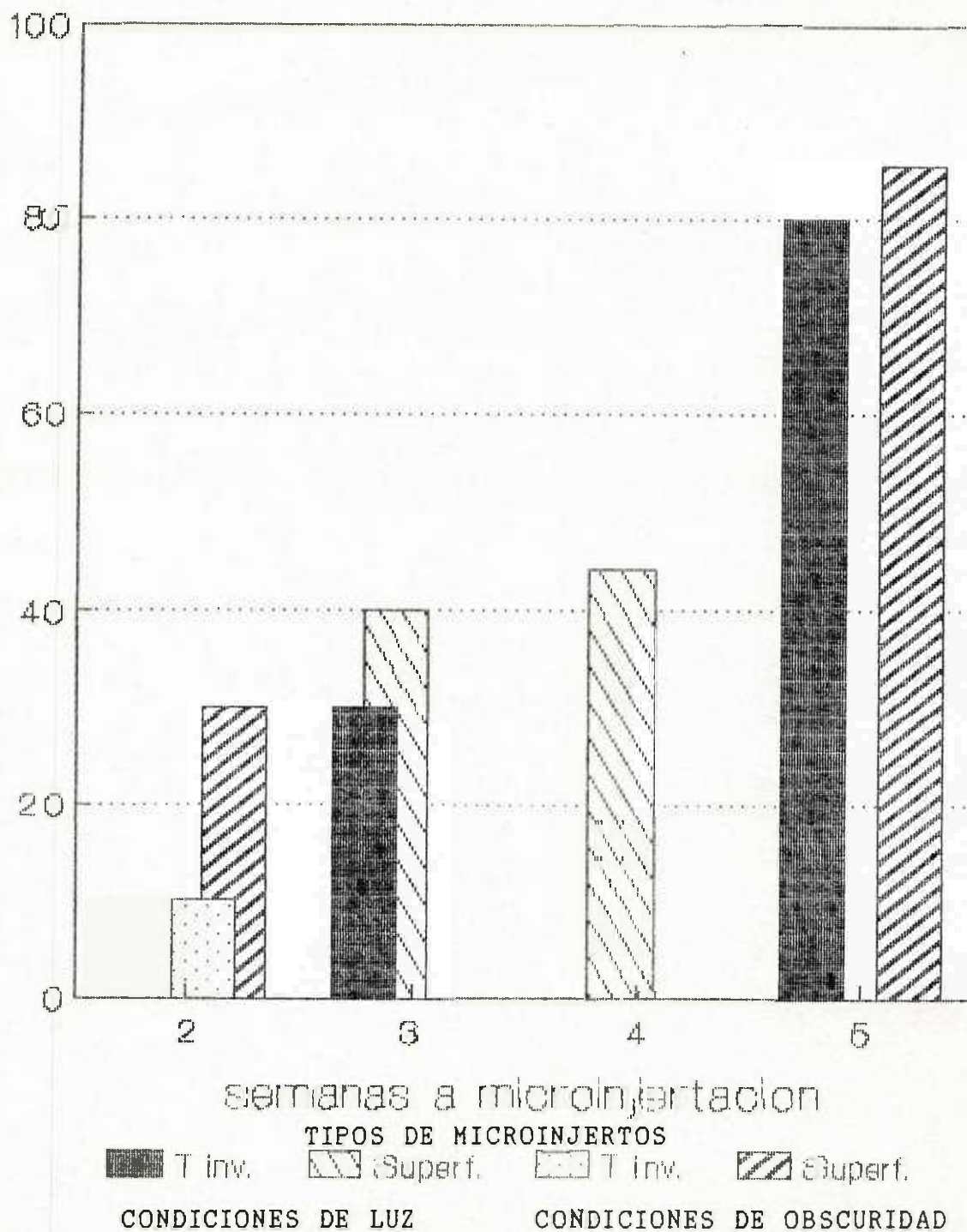
Grafica 2- Porcentaje de yemas establecidas sin brotar.



Grafica 3.- Porciento de absorcion



Grafica 4.- Porciento de contaminación



De acuerdo a los resultados obtenidos representados en la grafica número uno, podemos observar que: en porciento de brotación de yemas los mejores resultados se tienen en microinjertación de plántulas de tres semanas germinadas en obscuridad e implantando las yemas en una incisión en "T" invertida con un 66.6% de brotación de yemas; tambien en "T" invertida con patrones germinados bajo condiciones de luminosidad, con 62.5% de brotación y al injertar en la superficie decapitada del epicotilo de micropatrones germinados en condiciones de luminosidad con un 50% de brotación; al microinjertar en la superficie de micropatrones germinados en la obscuridad, no se presentó brotación. Estos resultados contrastan con los resultados presentados por Navarro, Roistacher y Murashige (1975), quienes encontraron que no existia diferencia de éxito al colocar la yema en la superficie o en "T" invertida.

Al injertar las yemas en micropatrones con edad de cuatro semanas de edad se obtuvo brotación (60%) solo con el tipo "T" invertida en micropatrones crecidos en obscuridad y (44.5%) en micropatrones crecidos en condiciones de luz.

Al tener los micropatrones la edad de dos semanas bajo condiciones de obscuridad y microinjertados en "T" invertida presentó un 44.4% de brotación y al microinjertarlas en la superficie del epicotilo decapitado de plántulas obtenidas bajo condiciones de luz, se obtuvo un 13% de brotación; al

microinjertar en plántulas de cinco semanas de edad se obtuvieron resultados de brotación únicamente al microinjertar en "T" invertida en plántulas obtenidas bajo condiciones de obscuridad, presentando un 20% de brotación.

De acuerdo al análisis de varianza en el porcentaje de brotación de yemas de naranjo dulce *C. sinensis* injertadas en micropatrones de naranjo agrio *C. aurantium*, presentado en el tabla número siete, correspondiente a resultados, se observa, que la mejor brotación se presenta en microinjertos en micropatrones de tres y cuatro semanas de edad con un porcentaje de brotación de 49.7 y 49.9 respectivamente, formando un segundo grupo en la microinjertación en micropatrones de dos y cinco semanas con un porcentaje de brotación de 19.4 y 15.0 respectivamente, presentando estadísticamente una diferencia altamente significativa entre los tratamientos y de acuerdo a la diferencia entre medias se formaron los dos grupos antes mencionados.

Con respecto al tipo de microinjertación observamos que con "T" invertida se tuvo un mayor porcentaje de brotación con un 42.8 en comparación con la microinjertación en la superficie decapitada del epicotilo con un 25.3%, presentando estadísticamente una diferencia significativa entre los dos tratamientos y de acuerdo a la diferencia entre medias se tuvo la formación de dos grupos.

Con respecto a los medios de luz y obscuridad para germinación y crecimiento de los micropatrones tenemos que: el mejor tratamiento para brotación es el correspondiente al

de obscuridad con un 41% en comparación con el tratamiento de luz, que presentó un 30.8%, a pesar de no haber diferencia estadística entre los tratamientos, si hubo la formación de dos grupos de acuerdo a la diferencia entre medias, en este es mejor el tratamiento bajo condiciones de obscuridad.

De acuerdo a los resultados presentados en la gráfica número dos, perteneciente al porcentaje de establecimiento de yemas sin brotar, tenemos los siguientes resultados: en la implantación en la superficie en micropatrones obtenidos bajo condiciones de luz se tienen 40%, 43%, 100% y 100% respectivamente a las dos, tres cuatro y cinco semanas de edad del micropatron; también en la implantación en la superficie decapitada del epicotilo del micropatron obtenido bajo condiciones de obscuridad, se obtuvieron 71.4%, 57%, 70% y 100% a las dos, tres cuatro y cinco semanas respectivamente ; en lo referente a microinjertación en "T" invertida en micropatrones obtenidos bajo condiciones de obscuridad, presentaron 29%, 40% y 80% de yemas establecidas sin brotar a las tres, cuatro y cinco semanas respectivamente; con respecto a microinjertación en "T" invertida en micropatrones obtenidos bajo condiciones de luz, se presentaron 55.5% y 100% de yemas establecidas sin brotar a las cuatro y cinco semanas unicamente.

De acuerdo al análisis de varianza en el porcentaje de yemas establecidas no brotadas, en el que se toman las medias de tratamiento para la presentación de dicho análisis

se observa, en lo referente a las semanas a microinjertación, que hay una diferencia estadística altamente significativa y de acuerdo a la DMS se forman tres grupos: siendo el de cinco semanas el de mas alto establecimiento; un segundo grupo formado por microinjertos a las dos y cuatro semanas y un tercer grupo conformado por microinjertos en micropatrones de tres semanas de edad. En lo referente al tipo de microinjertación y a los medios de obtención del micropatrón, no hubo diferencia entre dichos tratamientos, ni de acuerdo a la DMS hubo formación de grupos.

Los resultados presentados en la gráfica número tres, en la que se presenta el porciento de absorción de yemas, tenemos que en tipo de microinjerto y medio de obtención del micropatrón: a las dos semanas en "T" invertida y obscuridad un 50%, en "T" invertida y luz 46.7% y en la superficie y en obscuridad un 20%; a las tres semanas en la superficie y en obscuridad un 42.5%, en "T" invertida y en la superficie en luz se tiene 20%-30%; a las cuatro semanas solo en superficie y obscuridad se presenta un 30%; y a las cinco semanas en superficie y obscuridad se tiene un 71.4%.

De acuerdo a los resultados presentados en la gráfica número cuatro, con respecto a porciento de contaminación, tenemos como en el caso anterior primero el tipo de microinjeto y luego el medio de obtención del micropatrón: a las dos semanas en "T" invertida y en la superficie en condiciones de obscuridad un 10% y 30% respectivamente; a

las tres semanas en "T" invertida y en la superficie en condiciones de luz un 30% y 40% respectivamente; a las cuatro semanas solamente se presenta en la superficie y bajo condiciones de luz con un 44.4%; y a las cinco semanas en "T" invertida y luz un 80% y en la superficie y obscuridad con un 85.7%.

CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis de varianza del porciento de brotación de yemas, los mejores tratamientos en cuanto a la edad de los micropatrones, fueron a las tres y cuatro semanas; con respecto al tipo de microinjertación fué en "T" invertida ; y en cuanto al medio de obtención del micropatrón, fué en medio de obscuridad. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en la gráfica número uno.

De acuerdo al análisis de varianza del porciento de yemas establecidas sin brotar, se obtuvo un mejor establecimiento estadísticamente altamente significativo mejor en el material microinjertado en micropatrones de cinco semanas de edad; no habiendo diferencias estadísticas entre los tipos de microinjertación y medios de obtención del micropatrón.

En lo referente al porciento de absorción: el mayor porciento de absorción se tiene en microinjertos relizados en la superficie y en micropatrones de cinco semanas de edad obtenidos en obscuridad con un 71.4%. En los microinjertos en forma general se obtuvo mayor porciento de absorción en microinjertos realizados en la superficie en condiciones de obtención del micropatrón en luz y en obscuridad respectivamente.

En lo referente al porciento de contaminación tenemos: el mayor porciento se presenta en los microinjertos realizados en micropatrones de cinco semanas de edad en

superficie y oscuridad con 85.7% y en "T" invertida con luz en 80%; en promedio y en forma general se presentó mayor contaminación en el tipo de superficie y en oscuridad, en "T" invertida y con luz en el tipo de superficie y con luz y finalmente en "T" invertida y en oscuridad.
superficie y luz y finalmente "T" invertida y oscuridad.

Al momento de obtener la yema de la planta donadora, se debe poner especial cuidado en seleccionar una planta de buena apariencia, sana y vigorosa, ya que de lo contrario las características indeseables pueden ser transmitidas a la nueva planta al momento de realizar la microinjertación.

Debe tomarse muy en cuenta dentro del proceso de microinjertación la asepsia con la cual se debe llevar a cabo cada uno de los pasos requeridos, ya que puede haber contaminación y el inóculo no prospera al ser atacado por agentes nocivos que se encuentran en el medio ambiente.

En cuanto al tamaño de la yema, es necesario escoger las medidas que proporcionen un porcentaje de éxito aceptable y que origine plántulas sanas y vigorosas.

Una vez que el patrón se encuentre decapitado y a la yema se la hallan eliminado sus primordios foliares mas grandes, se recomienda al momento de realizar la microinjertación, que el tiempo que transcurra en estas operaciones sea mínimo para evitar una deshidratación de los tejidos, así como también se necesita una destreza manual del ejecutante para su buena realización.

Se requiere afinar la técnica de obtención de yemas para la microinjertación a partir de material reproducido en laboratorio de cultivo de tejidos.

Así mismo probar diferentes medios de establecimiento de yemas para evitar la aborción y semidesprendimiento.

LITERATURA CITADA

- 1.- Azaola, A. 1980. Microinjerto *in vitro* de Citricos. Departamento de Fisiología de Precosecha Subdirección de Investigación y Docencia. CONAFRUT S.A.R.H.(1) pp 33-36.
- 2.- Edriss, M.H.; and Burger, D.W. 1984. Micro-grafting Shoot tip Culture of Citrus on Tree Trifoliolate Rootstocks. *Scientia Horticulturae*. 23: 255-259.
- 3.- Fiorino, P. and Loreti, F. 1987. Propagation of Fruit Trees by Tissue Culture in Italy. *Mortscience* 22 (3): 353-358.
- 4.- González, M.; Peña, I.; González, R.; Zamora, V.; Rodríguez, I. 1977. Introducción en Cuba al Injerto *in vitro* de Apices de Brotes en el Género Citrus y Géneros Afines, Como una Forma de Obtener Plántulas Libres de Virus. *Agrotecnia de Cuba*. 9(2): 61-71.
- 5.- Jonard, R.; Macheix, J.J.; Martinez, I.; Mosella-Chancel, L.; Poessel, I; Villemur, P.1983. *in vitro* Micrografting and its Applications to Fruit Science. *Scientia Horticulturae*. 20:147-159.
- 6.- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-Assay with Tabacco Tissue Culture. *Physiology Plantarum*. Vol 15. pp 473-479.
- 7.- Murashige, T.; Bittes, W.P.; Rangan, T.S.; Naver, E.M.; Roistacher, C.N. and Molliday, P.B. 1972. A Technique of Shoot Apex Grafting and its Utilization Towards Recovering Virus Free Citrus Clones. *Hortscience*. 7(2):118-119.
- 8.- Navarro, L.1984 .Citrus Tissue Culture, INIA. Centro de Levante, Moncada, Valencia, España.
- 9.- Navarro, L.; Roistacher, C. and Murashige, T. 1975. Improvement of Shoot-tip Grafting *in vitro* for virus Free Citrus. University of Riverside, California, *Hortscience*. 10(5):471-477.
- 10.- Starrantino, A. and Caruso, A. 1988. *in vitro* Culture for Citrus Micropropagation. Instituto Sperimentale per l'Agromicoltura. Italy. *Acta Horticulturae*. 227:444-446.
- 11.- Starrantino, A. and Caruso, A. 1988. The Shoot-tip Grafting Technique Applied in Citriculture.

Instituto Sperimentale per l'Agromicoltura. Italy.
Acta Horticulturae. 227:101-103.

- 12.- Villalobos, A.V.M. 1985. Fundamentos Teórico-práctico de Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro de Documentacion. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México. pp 1-6.