

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“EFECTO DE LA SACAROSA Y COTILEDONES SOBRE EL
PRENDIMIENTO DE MICROINJERTOS *in vitro* DE NARANJA
Y LIMÓN (*Citrus sp.*)”**

Presentada por:

LIZ JULIETA LLIHUA QUISPE

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima - Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“EFECTO DE LA SACAROSA Y COTILEDONES SOBRE EL
PRENDIMIENTO DE MICROINJERTOS *in vitro* DE NARANJA
Y LIMÓN (*Citrus sp.*)”**

Presentada por:

Liz Julieta Lihua Quispe

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph. D. Jorge Jimenez Dávalos
PRESIDENTE

M. S. María Lourdes Tapia y Figueroa
MIEMBRO

Mg. Sc. Rosario Castro Muñoz
MIEMBRO

Blgo. Mg. Sc. Abelardo Calderón Rodríguez
ASESOR

Blga. Rosa Cabrera Pintado
CO - ASESORA

DEDICATORIA

A mi familia entera, por brindarme todo el amor que me colmó en todo momento.

A mi madre, que fue una esforzada y sacrificada agricultora que inculcó a todas sus hijas el interés por el estudio de las plantas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A Procitrus (Asociación de Productores de Cítricos del Perú), por el financiamiento económico brindado.

Al INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria), por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones, específicamente en la Subdirección de biotecnología.

A mi asesor Mg. Sc. Abelardo Calderón Rodríguez, por el apoyo académico que hizo posible la realización del presente trabajo.

A mi co-asesora Blga. Rosa María Cabrera Pintado, por las valiosas observaciones en el proceso de la experimentación y la redacción del trabajo.

A mi comité evaluador integrado por Dr. Jorge Eduardo Jiménez Dávalos, Mg. Sc. María de Lourdes Tapia Figueroa, y Mg. Sc. María del Rosario Castro, por las valiosas observaciones a la redacción del trabajo.

A la técnica Luz Guzmán, por la amabilidad brindada al compartirme su experiencia relacionada al manejo del laboratorio.

Al grupo de investigación de Uruguay, por las recomendaciones y conocimientos compartidos.

A la Sra. Reyna Marcelo, por el suministro de las colectas del material experimental.

A mi amigo P.O.P.O., por su compañía y apoyo moral durante todo el proceso experimental y redacción del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

A los profesores con quienes tuve la oportunidad de interactuar, gracias por su experiencia y conocimientos compartidos.

ÍNDICE GENERAL

I.	Introducción.....	1
II.	Revisión de Literatura	5
2.1.	Cítricos.....	5
2.1.1.	Origen y distribución.....	5
2.1.2.	Especies injerteras y portainjerto	6
2.1.3.	Brotación - Cosecha	9
2.1.4.	Características nutricionales de los cítricos	10
2.1.5.	Propagación de los cítricos	10
2.1.6.	Microinjerto de ápices caulinares <i>in vitro</i>	10
III.	Materiales y Métodos	13
3.1.	Lugar de ejecución	13
3.2.	Materiales	13
3.2.1.	Material vegetal.....	13
3.2.2.	Equipos y materiales diversos.....	13
3.3.	Metodología.....	14
3.3.1.	Tratamiento de desinfección para la obtención de plántulas portainjerto Citrange Troyer en condiciones <i>in vitro</i>	14
3.3.2.	Desinfección superficial y siembra de varetas para la obtención de meristemas.....	16
3.3.3.	Microinjertación	19
IV.	Resultados y discusión	23
4.1.	Tratamiento de desinfección para la obtención de plántulas portainjerto citrange troyer en condiciones <i>in vitro</i>	23

4.2.	Evaluación de la desinfección superficial y siembra de varetas para la obtención de meristemas.....	25
4.3.	Microinjertación	27
4.3.1.	Porcentaje de prendimiento.....	27
4.1.1.	Número de hojas desarrolladas en los microinjertos prendidos.....	33
4.1.2.	Tamaño de las microinjertos	36
4.1.3.	Hojas marchitas de los microinjertos.....	41
V.	Conclusiones.....	45
VI.	Recomendaciones.....	47
VII.	Referencias bibliográficas.....	48
VIII.	Anexos	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Tratamientos de desinfección preliminar de semillas del portainjerto	16
Tabla 2:	Tratamientos preliminares de desinfección superficial de varetas limón Eureka y naranja Washington Navel	18
Tabla 3:	Tratamientos de la microinjertación de limón Eureka	21
Tabla 4:	Tratamientos de la microinjertación de naranja Wshington Navel.....	21
Tabla 5:	Porcentajes de contaminación, germinación y afecciones de semillas portainjerto sembradas en diferentes tratamientos	23
Tabla 6:	Porcentaje de contaminación de quemados y producción de brotes de las varetas de limón Eureka en diferentes tratamientos de desinfección superficial	26
Tabla 7:	Porcentaje de contaminación de quemados y producción de brotes de las varetas de naranja Washington Navel en diferentes tratamientos de desinfección superficial.....	26
Tabla 8:	Intervalo de clasificación para determinación del tamaño de hojas de microinjertos prendidos.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Origen de los cítricos: C: cidro, NA: naranjo amargo, L: limonero, LM: limero, P: pummelo o zamboa, ND: naranjo dulce, M: mandarina.....	5
Figura 2:	Preparación del patrón Citrange Troyer para microinjertación. a) Retiro de testa y tegumento de las semillas; b) Materiales de desinfección superficial; c) Siembra en tubos de ensayo con medio de cultivo para germinación; d) Incubación en fitotrón 27±2 °C, 70% humedad, oscuridad total.....	15
Figura 3:	Colecta y desinfección de varetas a) Recolección de varetas de naranja Washington Navel y limón Eureka; b) Varetas remojadas en Benomyl; c) Materiales de desinfección superficial; d) Secado sobre placas petri estériles; e) Varetas en medio de cultivo para desarrollo de brotes.	17
Figura 4:	Proceso de microinjertación. a) Patrones; b) Decapitación del patrón; c) Vareta con brotes; d) Disección de brotes; e) Meristemo aislado de limón Eureka; f) Inserción del meristemo en el corte “T” del patrón; g) Medio de cultivo de microinjertación; h) Colocación de plántula microinjertada en el medio de cultivo; i) Microinjerto realizado.....	20
Figura 5:	Medición de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos. a) Meristemo colocado en el corte “T invertido”; b) Medición de hoja del microinjerto desarrollado (la flecha bidireccional indica la forma de medición de las longitudes de hojas).....	22
Figura 6:	Porcentaje de prendimiento de limón Eureka.....	28
Figura 7:	Microinjertos prendidos de limón Eureka. a) Tratamiento 1 (45g/L sacarosa con 2 cotiledones); b) Tratamiento 2 (45g/L sacarosa y 1 cotiledón). c) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa y 1 cotiledón); d) Tratamiento 6 (75g/L sacarosa y 0 cotiledones).....	29
Figura 8:	Porcentaje de prendimiento de naranja Washington.....	30

Figura 9:	Microinjertos prendidos de naranja Wshington Navel a) Tratamiento2 (45g/L sacarosa y 1 cotiledón). b) Tratamiento 3 (45g/L sacarosa y 0 cotiledones). c) Tratamiento 4 (75g/L sacarosa y 2 cotiledones). d) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa y 1 cotiledón). e) Tratamiento 6 (75g/L sacarosa y 0 cotiledones).....	32
Figura 10:	Número de hojas desarrolladas de los microinjertos limón Eureka.....	34
Figura 11:	Número de hojas desarrolladas de los microinjertos de naranja Washington Navel.....	35
Figura 12:	Tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka – Número de cotiledones	38
Figura 13:	Tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka – Concentración de sacarosa.....	38
Figura 14:	Tamaño de hojas de los microinjertos y naranja Washington Navel- Número de cotiledones	39
Figura 15:	Tamaño de hojas de los microinjertos y naranja Washington Navel- concentración de sacarosa.....	40
Figura 16:	Hojas marchitas en los microinjertos de limón Eureka.....	42
Figura 17:	Hojas marchitas en los microinjertos de naranja Washington Navel	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Mapa de distribución y producción de cítricos (Toneladas)	57
Anexo 2	Composición de medio Murashige y Skoog (1962) CAISSON LABS	58
Anexo 3	Composición de medio Murashige y Skoog (1962) con vitaminas White	59
Anexo 4	Resultados obtenidos de prueba preliminar de la desinfección superficial de semillas Citrange Troyer	60
Anexo 5	Análisis estadístico de prueba preliminar de la desinfección superficial de semillas Citrange Troyer	61
Anexo 6	Resultados obtenidos de prueba preliminar de la desinfección superficial de varetas de limón Eureka	63
Anexo 7	Análisis estadístico de la desinfección superficial de varetas de limón Eureka	64
Anexo 8	Resultados obtenidos de la desinfección superficial de varetas de naranja Washington Navel	66
Anexo 9	Análisis estadístico de la desinfección superficial de varetas de naranja Washington Navel	67
Anexo 10	Resultados obtenidos del prendimiento de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	69
Anexo 11	Análisis estadístico del prendimiento de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	71
Anexo 12	Resultados obtenidos de número de hojas desarrolladas de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	75
Anexo 13	Análisis estadístico de número de hojas desarrolladas de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	76
Anexo 14	Resultados obtenidos de tamaño de hojas desarrolladas de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	78
Anexo 15	Análisis estadístico de tamaño de hojas desarrolladas de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	80
Anexo 16	Resultados obtenidos de porcentaje de hojas marchitas de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	82
Anexo 17	Análisis estadístico de porcentaje de hojas marchitas de microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel	83

ABREVIATURAS

AIB: Ácido indolbutírico, hormona Auxina

ANOVA: análisis de varianza

°C: Grados Celsius

d: Amplitud de cada intervalo

DBCA: Diseño experimental de bloques completos al azar

DCA: Diseño experimental completamente aleatorizado

EE.UU.: Estados Unidos

f_i : Frecuencia absoluta

F_i : Frecuencia absoluta acumulada

h_i : Frecuencia relativa: f_i/n

H_i : Frecuencia relativa acumulada: F_i/n

IG3: Ácido giberélico (Hormona)

li : Intervalo de clase

in vitro: Palabra latín (dentro del vidrio), se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo.

K: Número de intervalos de clase

LE: Limón Eureka

mm: Milímetro

NaClO: Hipoclorito de sodio

MS: Medio de cultivo de Murashige y skoog

msnm: Metros sobre el nivel del mar

N: Normalidad

N: Tamaño de muestra

R: Rango recorrido

Tween 20: Surfactante hidrofóbico empleado para desinfección superficial.

WN: Naranja Washington Navel

W: ancho de clase

Xi: marca de clase del intervalo

RESUMEN

El presente trabajo tiene la finalidad de determinar la influencia de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y presencia de cotiledones del patrón en la microinjertación *in vitro* de los cítricos *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limón* (L.) Burm. Se desarrollaron ensayos preliminares de desinfección superficial tanto para la obtención de plántulas portainjerto Citrange Troyer y de varetas para la producción de brotes de limón Eureka y naranja Washington Navel. El mejor tratamiento de desinfección fue 0.16% de NaClO por 5 minutos para las semillas de portainjerto, y 1% de NaClO por 20 minutos para las varetas. Luego se aplicó la metodología de microinjertación de ápices caulinares de limón Eureka y naranja Washington Navel, que consistió en la inserción del meristemo dentro de la incisión del corte T invertida del epicótilo de la plántula del portainjerto, a la altura del cambium vascular, bajo un microscopio estereoscópico. Se realizó 6 tratamientos (combinación de los factores: 45g/L y 75g/L de sacarosa en el medio de microinjertación, con 0; 1 y 2 cotiledones del portainjerto). De los resultados, se concluyó que para la microinjertación de limón Eureka sobre Citrange Troyer, el tratamiento más recomendable respecto a la concentración de sacarosa fue de 45g/L para la obtención de mayor porcentaje de prendimiento, mayor número, tamaño y menor porcentaje de marchitez de las hojas de los microinjertos, y es independiente del factor número de cotiledones. Mientras que la microinjertación de naranja Washington Navel, los tratamientos con 45 ó 75 g/L de sacarosa en el medio de cultivo, no mostraron diferencia significativa y hubo mayor prendimiento cuando se empleaba un portainjerto sin cotiledones.

Palabras claves:

Microinjerto, *in vitro*, cotiledones, sacarosa, limón, naranja, *Citrus*.

ABSTRACT

The purpose of this work is to determine the influence of the concentration of sucrose in the culture medium and the presence of cotyledons of the standard in the in vitro microinjection of citrus fruits *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus limon* (L.) Burm. Preliminary trials of surface disinfection were carried out both for the production of Citrange Troyer rootstock seedlings and buds for the production of the straw lemon Eureka and orange Washington Navel. The best disinfection treatment was 0.16% NaClO for 5 minutes for the rootstock seeds, and 1% NaClO for 20 minutes for the straw. Then, the method of microinjection of the shoot apical meristem of lemon Eureka and orange Washington Navel was applied, which consisted in the insertion of the meristem into the incision of cut "T inverted" of the epicotyl of the rootstock seedling, at the height of the vascular cambium, under a Stereoscope microscope. Six treatments were carried out (combination of the factors: 45g / L and 75g / L of sucrose in the microinjection medium, with 0, 1 and 2 cotyledons of the rootstock). From the results, it was concluded that for the micrografting of lemon Eureka on Citrange Troyer, the most recommendable treatment with respect to the concentration of sucrose was 45g / L to obtain a higher percentage of capture, greater number, size and lower percentage of wilting of the leaves of the micrografts, and is independent of the factor number of cotyledons. While the Washington Navel orange micrografting, treatments with 45 or 75 g / L of sucrose in the culture medium, showed no significant difference and there was greater yield when using a rootstock without cotyledons.

Keywords:

Micrografting, in vitro, cotyledons, sucrose, lemon, orange, Citrus.

I. INTRODUCCIÓN

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en las regiones subtropicales y tropicales de Asia. Se caracterizan por ser árboles o arbustos, y producir grandes frutos carnosos de piel gruesa, ricos en vitaminas C y ácido fólico.

Los cítricos están entre los frutales más importantes a nivel mundial (ICA, 2012) y según FAO (2015), China presenta mayor producción de cítricos a nivel mundial con 29567 miles de T, pero España ocupa el primer lugar en exportación de cítricos con 3693.0 miles de T. En cuanto al hemisferio sur, Brasil es el mayor productor de cítricos con 18966 miles de T, pero Argentina ocupa el primer lugar en exportación de cítricos con 321.0 miles de T.

Perú ocupa el cuarto lugar en producción con 1159 miles de T y ocupa el sexto lugar como exportador con 116.1 miles de T de cítricos en total. (FAO, 2015). Los principales departamentos productores de cítricos en Perú son: Piura, Lambayeque, Lima, Ica, Junín y Cusco (MINAGRI, 2008).

Para competir en un mercado cítrico globalizado se necesita de la máxima eficiencia en todas las fases de la producción (Bertalmio *et al.*, 2012). Además, las plantas cítricas son susceptibles a una serie de enfermedades víricas como la tristeza, xorosis, o viroides como la exocortis (Fribourg, 2007), e influyen de forma determinante en la producción y rendimiento de las plantas, calidad de las frutas, limitan el uso de varios patrones y pueden ocasionar la muerte de la planta (Martínez-Hernández *et al.*, 2006; Vegas y Narrea, 2011, y Ferrucci, 1997). Para su control es imprescindible utilizar material de propagación certificado genética y sanitariamente y de buena calidad (Zamora *et al.*, 2007). Sin embargo, no ha sido posible encontrar árboles sanos en Perú, por lo que es necesario recurrir a métodos que permitan la obtención de plantas libres de virus a partir de la limpieza de plantas infectadas.

En el Perú, existe ya un compromiso de parte de los productores junto con los técnicos del INIA de desarrollar metodologías eficientes que pueden hacer factible la producción

masiva de cultivos cítricos, y que no se vea afectado el proceso de producción agrícola por enfermedades de diversos patógenos y se obtenga una buena producción de frutos (Zamora *et al.*, 2007).

Los métodos para el saneamiento de los cítricos, previamente existentes, son la termoterapia y plantas de origen nucelar. La termoterapia en cítricos es eficaz para la eliminación de algunas virosis, como tristeza, psorosis, impietratura, etc, pero es ineficaz para la eliminación de otras virosis, como la exocortis y la xyloporosis (Calavan *et al.*, 1976; Pina, 2009). Mientras, la técnica de cultivo nucelar *in vitro* permite la inducción de embriones nucleares, que formará, plantas nucleares libres de virus, debido a que en los cítricos éstos no se transmiten por semilla. No obstante, el principal inconveniente de esta técnica es que esas plantas nucleares tienen caracteres juveniles, es decir, demora en la producción de frutos en los primeros años (Navarro, 1979 y 2005).

Sin embargo, el método de la microinjertación *in vitro* de meristemas caulinares (Murashige *et al.*, 1972), ha superado los inconvenientes que presentaban los otros métodos de obtención de plantas libres de enfermedades transmisibles por injertos en los cítricos. Navarro (1979), lo reafirmó y lo certificó mediante el método biológico, quien consiguió eliminar en más de 80% a los virus exocortis, xyloporosis y stubborn, y en 100% al virus de la tristeza.

En la actualidad, la microinjertación es la vía para disponer de material de propagación certificado que se puede llevar a las plantaciones comerciales, así como la forma de garantizar el estado sanitario de las accesiones de un banco de germoplasma de cítricos para su utilización en los programas de mejoramiento genético y para la conservación adecuada de los recursos fitogenéticos. La aplicación exitosa de esta técnica radica en el hecho de que los patógenos que causan enfermedades transmisibles por injerto se mueven por los haces vasculares de la planta y no alcanzan el extremo del ápice caulinar. Pero se debe garantizar que la planta patrón para el microinjerto se origine a partir de una semilla libre de patógenos (Pina, 2009; CEDEFUT, 2008). Por esas razones se decidió emplear la técnica de microinjertación *in vitro*, para proveer un material saneado a los citricultores, el cual les sea favorable en la producción y en la competitividad del mercado de los cítricos.

Además, ciertos factores deben ser tomados en cuenta para el prendimiento del injerto al patrón en el proceso de microinjertación. Respecto a ello, Navarro (1979) desarrolló la microinjertación de ápices caulinares en cítricos europeos, y concluyó que la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y la presencia de los cotiledones del portainjerto son importantes para el prendimiento de los microinjertos; el autor afirmó que a 75% de concentración de sacarosa obtuvo mayor número de injertos prendidos, y también vio la necesidad de eliminar los cotiledones del patrón porque aparentemente disminuían el crecimiento de los ápices injertados. Siendo estos factores fáciles de controlar y reproducirse, y de considerarse importantes para el éxito en el prendimiento de los microinjertos, en este trabajo se optó por establecer como tratamientos a las combinaciones de los diferentes niveles de ambos factores (concentraciones 45g/L y 75g/L de sacarosa, y con 0; 1 y 2 cotiledones) para evaluar los efectos sobre la microinjertación de las variedades limón Eureka y naranja Washington Navel provenientes de la sierra de Lima (Huaral) y empleando como patrón al citrange Troyer proveniente de California.

Se debe recordar que naranja Washington Navel no presenta semillas y la forma de propagación es mediante la injertación, pero resulta mejor mediante la microinjertación por meristemo caulinar porque permite obtener plantas sanas libre de virus. Por otro lado, la agricultura moderna utiliza sólo unas variedades seleccionadas de alto rendimiento y calidad para cada cultivo y esto lleva al abandono de variedades tradicionales, como es el caso de limón Eureka que es la primera variedad de los cítricos, pero en el Perú se prefiere consumir más el limón sutil, por presentar mayor acidez. Ante esto se ve la necesidad de su conservación y valorar este recurso fitogenético, además, el presidente de la Asociación de Productores de Cítricos del Perú (Procitrus) señaló que limón Eureka es un producto promisorio para la exportación porque es más apreciado en el mercado americano y europeo.

Así mismo, se espera contribuir con la determinación de un protocolo de microinjertación óptimo y sirva de base para futuros trabajos de mejoramiento y saneamiento de cítricos con importancia económica en la agricultura peruana.

Habiendo visto la necesidad de saneamiento de los cítricos y la importancia de la microinjertación en este proceso, la presente investigación tuvo como objetivos los siguientes:

Objetivo general

Determinar la influencia de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y presencia de cotiledones del patrón (Citrange Troyer) en la microinjertación *in vitro* de los cítricos limón Eureka y naranja Washington Navel.

Objetivos específicos

- Determinación de la concentración y tiempo de remojo de hipoclorito de sodio para la desinfección superficial de semillas Citrange Troyer y de varetas de limón eureka y naranja Washington Navel.
- Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa (45 y 75g/L) en el medio de cultivo y de los números de cotiledones (0, 1 y 2 cotiledones) del patrón Citrange Troyer sobre el prendimiento de los microinjertos de naranja Washington Navel y limón Eureka.
- Determinar la influencia de la concentración de sacarosa (45 y 75g/L) del medio de cultivo y de los números de cotiledones (0, 1 y 2 cotiledones) del patrón Citrange Troyer sobre el número de hojas desarrolladas de los microinjertos de naranja Washington Navel y Limón Eureka.
- Determinar la influencia concentración de sacarosa (45 y 75g/L) del medio de cultivo y de los números de cotiledones (0, 1 y 2 cotiledones) del patrón Citrange Troyer en la variable tamaño de hojas de los microinjertos de naranja Washington Navel y Limón Eureka.
- Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa (45 y 75g/L) del medio de cultivo y de los números de cotiledones (0, 1 y 2 cotiledones) del patrón Citrange Troyer sobre la marchitez de hojas de los microinjertos de naranja Washington Navel y Limón Eureka.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CÍTRICOS

La palabra cítricos se designa habitualmente a los árboles frutales que producen frutos ácidos, como el naranjo, el limón, el mandarino, el pomelo y otros. De las 124 especies de cítricos pertenecientes a la Familia Rutáceas, tan sólo 16 son las que forman el género *Citrus*, que junto con las 4 del género *Fortunella* (Kumquats) son las especies de cítricos cultivados de interés comercial (Domínguez, 2014).

2.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Los cítricos se originaron en las regiones subtropicales y tropicales de Asia (véase la fig. 1), específicamente de la región del Himalaya en la China, hace unos 20 millones de años antes de Cristo (González, 2014 y Zaragoza *et al.*, 2011).

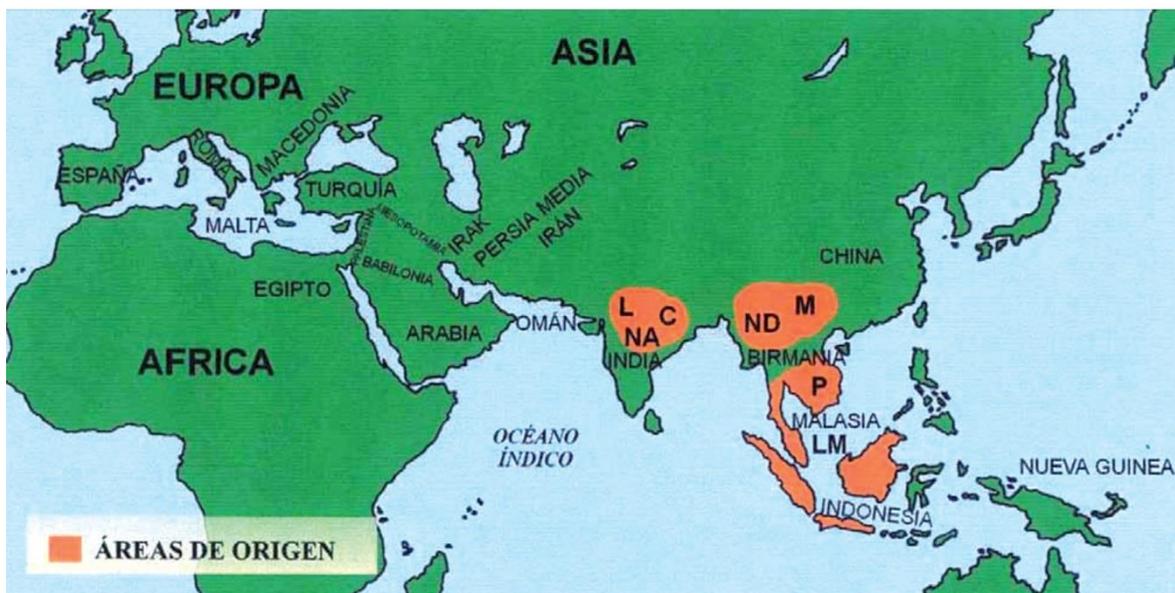


Figura 1: Origen de los cítricos: C: cidro, NA: naranja amargo, L: limonero, LM: limero, P: pummelo o zamboa, ND: naranja dulce, M: mandarino.

FUENTE: Zaragoza *et al.*, 2011.

Su cultivo se confunde con la historia de las antiguas civilizaciones, quienes lo emplearon para elaborar perfumes y más tarde para consumir sus frutos. Es con el esplendor de las civilizaciones china e hindú cuando el cultivo inicia su propagación hacia el sur de Japón, el archipiélago de Malasia y todos los países del sureste asiático (Morin, 1985).

Las primeras plantaciones regulares de naranjos se realizó en diversas comunidades de Valencia a fines del siglo XVIII, en jardines y huertos (González, 2014).

En 1493, al igual que el resto de América, los primeros cítricos fueron introducidos en el Perú por los españoles. Poco a poco se fueron difundiendo, primeramente en la costa, luego a algunos valles abrigados de la sierra, y por último a la zona de la selva (Morin, 1985 y González, 2014; FAO, 2015) y actualmente se distribuye en todo el mundo (Anexo 1).

2.1.2. ESPECIES INJERTERAS Y PORTAINJERTO

A continuación se describen las dos especies a injertar y el portainjerto utilizados en el experimento. Estas especies cítricas, pertenecen a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Rosidae, de orden Sapindales, familia Rutaceae, género *Citrus* (Lavado, 2008).

El género *Citrus*, está compuesto por un conjunto de pequeños árboles o arbustos, con hojas perennes y generalmente glabras, aunque en algunas especies son pubescentes, con bordes serrados, pecíolos más o menos alados o sin alas y glándulas provistas de aceites aromáticos.

a. *Citrus limon* (L.) Burm

- **Nombres comunes**

Limón Eureka, Limonero.

- **Descripción botánica**

El limón Eureka (LE) es una variedad de limonero, el árbol es vigoroso, con hábito de crecimiento abierto y poco espinoso. Es muy productivo y muy precoz en la entrada en producción. Hojas de color verde pálido, oblongas a elípticas, ápice obtuso y margen aserrado-dentado. Flores solitarias o en cimas terminales o axilares, cuatro o cinco sépalos cortos de color verde y unidos entre sí, cinco pétalos de coloración blanca o matizados de

púrpura, estambres libres o más o menos soldados entre sí y en número múltiple al de pétalos, con anteras alargadas; el ovario es súpero y gamocarpelar (Beñatena y Anderson, 1996).

El fruto es de tamaño medio, de forma elíptica u oblonga a veces ovoide, con protuberancia apical pequeño y sin cuello en la zona peduncular. Se puede decir que no tiene semillas y el periodo de recolección se distribuye a lo largo del año, dependiendo mucho su florescencia de la climatología y de las técnicas culturales utilizadas. En nuestras condiciones ambientales el grueso de la recolección se efectúa de octubre a febrero (Soler, 1999). Es la variedad más importante de California (alrededor del 75 por 100 del total de las plantaciones) y la primera variedad del mundo (García *et al.*, 2003).

- **Distribución geográfica**

El limón Eureka es un cultivar de limonero, éste parece ser originario de la zona este de la región del Himalaya en la India y áreas adyacentes. Su cultivo fue introducido en China en tiempo de la dinastía Sung (760-1297 d. C.) y en la cuenca mediterránea, los árabes lo difundieron por los años 1000-1200 d. C.) (García *et al.*, 2003). Pero, fue obtenida en Los Ángeles, California, en el año 1838, de una siembra de semillas de frutos, tal vez de la variedad “Lunario” (García *et al.*, 2003).

Se cultiva en California, Australia, Sudáfrica, Argentina e Israel (García *et al.*, 2003).

b. *Citrus sinensis* (L) Osbeck. variedad Washington Navel

- **Nombres comunes**

Naranja navel 'Washington Navel', naranja dulce, naranja Wando

- **Descripción botánica**

El naranja Washington Navel (WN) se originó por mutación, probablemente de la variedad Bahía en Brasil. Es una variedad de copa vigorosa, de hojas grandes; con tendencia a floraciones fragantes, muy abundantes (González, 2014), de color blanco; su tronco no presenta espinas o con muy pocas. Posee una copa redondeada; con hojas de forma lanceolada, de color verde oscuro, brillante, y fragantes al estrujarlas. Su fruto es de gran

tamaño, muy precoces, de color anaranjado, de corteza ligeramente rugosa y fácil de pelar, pulpa de color naranja intenso, sabor dulce, no tiene semilla, pero es supernumerario, es decir, pequeños frutos que aparecen dentro del fruto principal por una aberración genética (Soler, 1999).

- **Distribución geográfica**

Actualmente, el naranjo es uno de los frutales más extendidos por todo el mundo, siendo los principales países productores: Brasil, Estados Unidos, España (Valencia, Murcia, Sevilla y Huelva), Italia, México, India, Israel, Argentina y China. Esta variedad puede adaptarse a casi todos los climas, exceptuando el desierto y las zonas costeras. (Soler, 1999).

c. Patrón o portainjerto *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* (Citrange Troyer)

Citrange Troyer pertenece al género *Citrus*, es una especie híbrida se origina del cruce de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) var. Washington Navel y naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), llevado a cabo en 1909 por Savage (Agusti, 2003). Ha sido uno de los híbridos más cultivados del grupo de los citranges, siendo masivamente utilizado como portainjerto en España, a mediados de los años 70 y 80 (Castle, 1978). Actualmente, tiene importancia en E.E.U.U. (California), Israel, Sudáfrica y Australia (Agusti, 2003).

Pozo F. (2005) demostró que existe una estrecha relación entre el peso y el diámetro ecuatorial del fruto, tanto en citrumelo Swingle como en citrange Troyer. Por el contrario, no existió una relación entre el tamaño del fruto y su contenido de jugo, ni menos con el grosor de cáscara, para ninguno de los portainjertos. Citrange Troyer indujo un mayor calibre de fruta, además, mantuvo una adecuada relación sólidos solubles/acidez por más tiempo en el árbol. Por otro lado citrumelo Swingle mostró una mejor eficiencia productiva (en número y peso total de frutos producidos).

El Citrange Troyer es resistente a la Tristeza y Xiloporosis, pero es susceptible a la exocortis, sales y suelos calcáreos. Tampoco es tolerante al nemátodo Barrenador, sin embargo existen algunas fuentes de Citrange Carrizo que son tolerantes. La variedad Citrange es susceptible al marchitamiento repentino y su tolerancia a la *Phytophthora* y al nemátodo del cítrico depende de la especie de *Phytophthora* y del biotopo del nemátodo. Su

tolerancia al frío es similar a la de su progenitor, el naranjo Trifoliado. Presenta problemas en los suelos calcáreos de la costa y en los suelos de baja fertilidad de la selva (Villachica, 1992).

2.1.3. **BROTACIÓN - COSECHA**

La época de floración y el ritmo de las brotaciones están controlados por los cambios de temperatura que se producen en las diferentes estaciones, por lo que la floración variaría de marzo a julio en zonas de clima Mediterráneo, aunque en clima Tropical el crecimiento es prácticamente continuo. Las yemas brotan cuando la temperatura del suelo supera los 12°C, sin importar la del aire. Una vez la yema ha empezado a brotar, un aumento de temperatura actúa sobre el balance hormonal y la movilización de reservas haciendo que aumente el desarrollo vegetativo. En un árbol, las yemas que están situadas en la madera joven y próxima al ápice presentan mayor porcentaje de brotación que las que se sitúan en la madera vieja. Dado que todas las yemas en un mismo árbol están expuestas a los mismos factores exógenos, las diferencias de brotación entre ellas deben estar provocadas por factores endógenos (Martínez, 2015).

Entre los factores endógenos, la presencia del fruto en los cítricos, ejerce un papel decisivo en la inhibición de la brotación de las yemas axilares y el desarrollo vegetativo. Este efecto se relaciona, fundamentalmente, con factores nutricionales y hormonales. También, durante el período de déficit hídrico se reduce significativamente la brotación y el desarrollo vegetativo. La recuperación del estado hídrico supone el restablecimiento del crecimiento vegetativo y la aparición de nuevos brotes (Agusti, 2010).

En cuanto al factor hormonal, la acumulación de auxinas en áreas vegetativas regula el mantenimiento de la dominancia apical o elongación, y las citoquininas promueven el crecimiento de las yemas laterales, promoviendo la movilización de nutrientes hacia las hojas, la germinación de las semillas y desarrollo de los brotes (Lluna, 2006).

La época de cosecha es variable de acuerdo a la especie y a la variedad. El momento adecuado para la cosecha es cuando el color amarillo anaranjado cubre la superficie total de la fruta, en algunas especies como la mandarina cuando su color característico cubre un 80%. Es decir, en este estado también la fruta ha llegado a su madurez y cuenta con las características de mejor calidad (FAUTAPO, 2015).

2.1.4. **CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LOS CÍTRICOS**

La fruta de los diferentes cítricos son muy conocidas por su riqueza en antioxidantes, vitaminas A y C, ácido fólico y minerales como el potasio, el magnesio y calcio; fibra; presentan glándulas ubicadas principalmente en la epidermis que segregan aceite y aroma (Rincón *et al*, 2016).

2.1.5. **PROPAGACIÓN DE LOS CÍTRICOS**

En teoría, los cítricos es posible la propagación sexual mediante semillas que son apomícticas (poliembriónicas) y que vienen saneadas. No obstante la reproducción a través de semillas presenta una serie de inconvenientes: dan plantas que tienen que pasar un período juvenil, que además no son bastante vigorosas y que presentan heterogeneidad. Por ello, esta técnica, sólo es común aplicar para la obtención de portainjertos (Rojas, 2001).

Es preferible la propagación asexual para las diversas especies en general y en concreto mediante injerto de yema. Si se precisa el sobreinjertado para cambiar de variedad, se puede hacer el injerto de chapa que también da muy buenos resultados.

La injertación es un tipo de propagación, que en general requiere de una gran superficie, se encuentra limitado por la época del año y la obtención de semilla adecuada. Además, puede promover la transmisión de enfermedades, especialmente sistémicas (micoplasmas, virus, viroides) (Iglesias *et al.*, 2001).

Como una alternativa de saneamiento, para lograr plantas de cítricos libres de patógenos, se ha desarrollado la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Camacho, 2008).

2.1.6. **MICROINJERTO DE ÁPICES CAULINARES *in vitro***

La técnica de microinjertación *in vitro* se fundamenta en el hecho de que la presencia de los virus y agentes similares en las plantas suele estar restringida al floema, pero en los ápices caulinares de tamaño adecuado (generalmente de menos de 0.5mm) no tienen desarrollado este tipo de tejido y por tanto no alojan a dichos patógenos. Y los ápices se colocan sobre una plántula, debido a que el ápice procede una especie leñosa, por lo que no se desarrollaría bien cuando son colocados directamente sobre un medio de cultivo (Pina, 2009).

La técnica de microinjertación *in vitro* fue descrita por primera vez por Murashige *et al.* (1972), quienes publicaron los resultados de amplios estudios en que evaluaron diferentes variables y establecieron las condiciones óptimas para su realización. Éste método es eficaz en los virus como tristeza, psorosis, impietratura y también lo es para los viroides como la exocortis, cachexia, stubborn y otros, por lo que se recomienda como un método para el saneamiento.

En este sentido, esta técnica supera a la termoterapia, ya que en esta última se observó en algunas plantas, una eliminación temporal o aparente del patógeno y al cabo del tiempo se activa nuevamente el mismo (Pina, 2009). Además, empleando la microinjertación se obtuvo la ventaja de obtener plantas sin caracteres juveniles lo cual favorece en la producción de frutos en un tiempo intermedio, contrariamente ocurría en el caso de la técnica de plantación nucelar (Zamora *et al.*, 2007 y Zaragoza, 2011). Por esta razón, la microinjertación *in vitro* se le considera como una técnica eficiente que supera algunos inconvenientes de las otras técnicas y permite obtener plantas libres de virus.

No obstante, la técnica de microinjertación en combinación con las técnicas de termoterapia, o con la inducción de plantas de origen nucelar, constituyen alternativas muy prometedoras para obtener plantas de cítricos libres de virus (Rojas, 2001).

Así también, la microinjertación se complementaría muy bien con la técnica de protección cruzada que podría aplicarse a las plantas sanas obtenidas de la microinjertación como una pre-inmunización.

Existen cepas víricas agresivas que pueden afectar en ciertos cultivares de cítricos independientemente del patrón utilizado (CIPF, 2016). Esto afecta considerablemente a la calidad del fruto y al rendimiento de millones de árboles infectados por estas cepas agresivas en la mayoría de las explotaciones de cítricos de todo el mundo, como se da el caso del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), excepto en las de la cuenca del Mediterráneo, donde no están presentes cepas agresivas o no son predominantes. El CTV es la especie más numerosa y compleja del género *Closterovirus* (Moreno *et al.*, 2008), los nuevos genotipos han divergido de la población ancestral o han surgido por recombinación con éstas cepas (Harper *et al.*, 2008). Su vector principal es el pulgón negro o café de cítricos (*Toxoptera citricida* K), pero más se disemia por la poda cuando no se esteriliza bien los instrumentos y

mediante las injertaciones (Peña, 2009). Para manejar de manera eficaz la enfermedad del picado del tallo o acanaladuras, algunos productores de cítricos han adoptado una estrategia que consiste en inocular de forma profiláctica a los árboles con cepas del CTV poco virulentas, también conocida como protección cruzada (da Graça y van Vuuren, 2010).

La microinjertación consiste en injertar un ápice caulinar (menor de 0,2 mm) tomado del brote de una planta que presente algún patógeno transmisible por injerto, sobre un patrón cítrico obtenido por germinación de semilla *in vitro*. Se realiza en condiciones asépticas y con la utilización de un microscopio estereoscópico y el instrumental adecuado. Con posterioridad (a las 5-8 semanas) la planta microinjertada se lleva a condiciones ambientales externas, mediante trasplante a maceta con sustrato apropiado o a través del sobreinjerto sobre patrón vigoroso, lo que acelera su desarrollo (Zamora *et al.*, 2007).

Rodrigo (2006) explica que existe una posible influencia de la composición del medio de cultivo en el prendimiento de los microinjertos; aunque existen múltiples factores que intervienen en este proceso, siendo éstos: la compatibilidad o la afinidad entre el patrón e injerto, condiciones favorables de humedad, temperatura y aireación; contacto o estrecha proximidad de las capas del cambium en patrón e injerto, rigidez mecánica para mantener la posición de ambos hasta que se forme la unión, escasa edad del injerto y del patrón, particularmente del primero y un grado alto de actividad vegetativa en ambos.

Navarro (1979) realizó con éxito la microinjertación *in vitro* de meristemas de cítricos y describió que algunas características del patrón son importantes, como la germinación de éstas por semillas en oscuridad, la edad del patrón (de aproximadamente 2 semanas después de germinación *in vitro*), la eliminación de sus cotiledones y del ápice de la raíz (dejando una porción de raíz de 4-6 cm). Además Navarro, menciona que la concentración de sacarosa influencia en el desarrollo de número y longitud de brotes de las yemas axilares a injertar, aseguró que la concentración de sacarosa de 3 por ciento es ideal.

Zamora *et al.* (2007), precisa que es indispensable la comprobación de que la planta obtenida este sana, mediante la realización de las pruebas de diagnóstico que se considere necesario realizar, y una vez concluidas dichas pruebas, cuando se hable de una planta sana significará que se encuentra libre de los patógenos para los cuales se realizaron las pruebas de diagnóstico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria, ubicado en Avenida la Molina 1981, La Molina 15024, provincia Lima, departamento Lima, con una altitud aproximada de 241 msnm, Longitud 76°56'43" W y latitud 12°04'36" S.

3.2. MATERIALES

3.2.1. MATERIAL VEGETAL

- *Patrón para el microinjerto:* Se usó semillas de *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* (Citrange Troyer código CY124) N° lote 4^a51701, que previamente recibieron un pretratamiento que consistió en la inmersión en agua a 52°C y con hidroxiquinolina.

- *Varietades a injertar:* Para la microinjertación se empleó meristemos de las varetas extraídas de plantas madres de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedad Washington Navel y *Citrus limon* (L.) Burm variedad eureka, provenientes del campo de la EEA Donoso- Huaral del INIA, carretera Km 5.6 de Chancay-Huaral, 180 m.s.n.m. de altitud, 11°28'00" S.

3.2.2. EQUIPOS Y MATERIALES DIVERSOS

a. Equipos

- | | |
|-----------------------------|----------------------|
| - Autoclave vertical | - Refrigeradora |
| - Potenciómetro | - Fitotrón |
| - Balanza analítica | - Estufa |
| - Microscopio estereoscopio | - Agitador magnético |
| - Cámara de flujo laminar | - Destilador |
| - Horno microondas | |

b. Insumos

- Agar
- Agua destilada
- Alcohol 70%
- Alcohol 96%
- Detergente
- Hipoclorito de sodio
- NaOH/Cl 1N
- Sacarosa
- Sales MS Sigma.M5524
- Tween 20

c. Materiales de vidrio

- Tubos de ensayo de vidrio 25x200mm y 25x150mm
- Beaker de 50, 500 y 1000mL
- Placas petri de 100 y 120 mm
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10mL
- Probetas graduadas de 10, 100, 500 y 1000mL.

d. Instrumentos

- Hojas de bisturí N° 10 y N°11
- Mango de bisturí N°7
- Tijera de podar
- Pinzas grandes, medianas y de punta fina
- Mechero de alcohol
- Gasa y papel toalla
- Papel filtro
- Papel aluminio

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS PORTAINJERTO CITRANGE TROYER EN CONDICIONES *in vitro*

Se siguió el siguiente procedimiento:

- Se extrajeron las testas y tegumentos de las semillas de Citrange Troyer (Figura 2 a).
- En condiciones asépticas de cámara de flujo laminar, se hizo grupo de 10 semillas envueltos con gasa estéril.
- Seguidamente se realizó la desinfección superficial (Figura 2b), que consistió en remojar en alcohol 70° por un minuto. Luego, se remojó en diferentes concentraciones 0.16 (p/v)

de solución de hipoclorito de sodio (NaClO), adicionado de tween 20 (2 gotas por cada 100ml), según tratamiento (Tabla 1), y finalmente se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril

-Para la siembra, cada semilla se tomó con una pinza estéril, y colocó en un tubo de ensayo conteniendo 15mL de medio MS (Anexo 1), para la germinación (Figura 2c).

-Los tubos conteniendo las semillas fueron incubados en una cámara climática a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% de humedad relativa y oscuridad, por un periodo de 4 a 9 semanas (Figura 2d), y así se obtuvo las plántulas patrón en condiciones *in vitro*.

Para la determinación del protocolo de desinfección, se realizó ensayos preliminares de desinfección superficial variando la concentración de NaClO (0.08, 0.2 y 0.8% (p/v) por 5 minutos de tiempo de remojo, como se muestra en la Tabla 1.



Figura 2: Preparación del patrón Citrange Troyer para microinjertación. a) Retiro de testa y tegumento de las semillas; b) Materiales de desinfección superficial; c) Siembra en tubos de ensayo con medio de cultivo para germinación; d) Incubación en fitotrón $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% humedad, oscuridad total.

FUENTE: Edición propia, 2017

Tabla 1: Tratamientos de desinfección preliminar de semillas del portainjerto

Tratamientos	Unidades experimentales (n)	[NaClO] (%)	Tiempo (minutos)
Testigo	30	0.16	5
T₁	30	0.08	5
T₂	30	0.16	10
T₃	30	0.2	10
T₄	30	0.8	10

FUENTE: Edición propia, 2017

Para determinar los mejores tratamientos de desinfección superficial de las semillas se empleó como diseño experimental un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 4 tratamientos, 3 repeticiones, cada una con 30 unidades. A un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$). El tratamiento testigo está dado por un protocolo establecido por MGAP (2011).

Los datos, de todos los diseños experimentales del presente documento, fueron procesados empleando el software *Infostat versión 2015*.

Las variables respuestas fueron:

- *Porcentaje de contaminación*: Determinando la relación de número de contaminados sobre el total de semillas sembradas, multiplicando por el 100 por ciento.
- *Porcentaje germinación*: Determinando la relación de número de semillas germinadas, sobre el total de semillas sembradas, multiplicando por el 100 por ciento.
- *Porcentaje de semillas quemadas por el NaClO*: Determinando la relación de número quemadas por el NaClO, sobre el total de semillas sembradas, multiplicando por el 100 por ciento.

3.3.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL Y SIEMBRA DE VARETAS PARA LA OBTENCIÓN DE MERISTEMOS

Las varetas de *Citrus sinensis* var. Washington Navel y *Citrus limon* (limón eureka), recolectadas (Figura 3a) en campo de plantas madre, de 25-30 cm de longitud y un diámetro de 1cm, fueron pre-desinfectadas como se describe a continuación:

- Lavado con detergente, cepillado y abundante agua de caño
- Corte a 15cm de longitud (con 3 nudos), con tijeras de podar desinfectadas, el extremo superior de forma horizontal y el extremo inferior en forma de bisel y se quitaron restos de pedicelos.
- Remojo en benomyl 2g/L por una hora (Figura 3b), enjuague con agua destilada. Luego en condiciones estériles en cámara de flujo laminar, se procedió a realizar la desinfección superficial (Figura 3c):
- Sumergir en alcohol 70% por un minuto
- Remojar en solución de NaOCl, adicionado tween 20 (dos gotas por cada 100 ml) por 20 minutos. Para determinación de la concentración adecuada de NaClO que se empleó en el protocolo de desinfección superficial se desarrollaron diferentes tratamientos preliminares que se muestran en la Tabla 2.
- Enjuagar con agua destilada estéril tres veces

Luego, las varetas se secaron sobre placas Petri estériles (Figura 3d) y se sembró cada vareta (Figura 3e) en un tubo de ensayo que contenía el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido, suplementado con vitaminas White (1963) (ANEXO 2).

Se incubó en una cámara climática o fitotrón con 32°C de temperatura, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, intensidad luminosa de 1000 lux y 70% de humedad relativa, hasta que todos los brotes que desarrollan de las yemas laterales alcanzaran dos centímetros de longitud.



Figura 3: Colecta y desinfección de varetas a) Recolección de varetas de naranja Washington Navel y limón Eureka; b) Varetas remojadas en Benomyl; c) Materiales de desinfección superficial; d) Secado sobre placas petri estériles; e) Varetas en medio de cultivo para desarrollo de brotes.

FUENTE: Edición propia, 2017

Tabla 2: Tratamientos preliminares de desinfección superficial de varetas limón Eureka y naranja Washington Navel

Tratamientos (T)	Unidades experimentales (n)	[NaClO] (%)	Tiempo (minutos)
Testigo	20	0.88	10
T1	20	0.70	10
T2	20	0.88	20
T3	20	1.00	20
T4	20	1.50	20

FUENTE: Edición propia, 2017

Los datos de las varetas se distribuyeron en un Diseño Completamente al Azar (DCA), 4 tratamientos, 3 repeticiones, 20 unidades por tratamiento (Tabla 2); a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$). El tratamiento testigo está dado por un protocolo establecido por MGAP (2011).

Los datos fueron procesados empleando el software *Infostat* versión 2015.

Las variables repuestas fueron:

- *Porcentaje de contaminación:* Se determinó por la relación entre el número de varetas contaminadas con bacterias u hongos y el número total de varetas sembradas, multiplicando por el 100 por ciento.
- *Porcentaje de quemados por el NaClO:* Se determinó por la relación entre el número de varetas que tienen un aspecto de quemadas por el NaClO y el número total de varetas sembradas, multiplicando por el 100 por ciento.
- *Número de yemas producidas por cada vareta:* Se cuantificó las yemas desarrolladas en cada vareta y se promedió por el total de varetas sembradas.

3.3.3. MICROINJERTACIÓN

Se siguió la metodología de microinjertación de cítricos desarrollada por Navarro (1975):

- Se tomó una plántula etiolada de Citrange Troyer obtenidas de las semillas sembradas anteriormente, de 1-3 meses de edad; se cortaron las raíces secundarias y parte de la raíz principal, además de los cotiledones (0; 1 y 2, según tratamiento) (Tabla 3 y 4).
- Se dejó 4-5 cm de longitud del tallo y 2-3 cm de longitud de la raíz.
- En el extremo superior del tallo se realizó un corte en forma de T invertida haciendo uso de un microscopio estereoscopio.
- Luego, se tomó una varetta con brotes de al menos 2 cm de longitud de limón Eureka (o de naranja Washington Navel) según tratamiento.
- Se procedió al aislamiento del ápice meristemo caulinar, usando un bisturí N°11 y pinza de punta fina, bajo un microscopio estereoscopio y se disecó el meristemo.

Después, cada meristemo aislado se insertó dentro de la incisión del corte T invertida del epicótilo de la plántula del portainjerto, abriéndose el tejido epidérmico y se colocó a la altura del cambium vascular, bajo un microscopio estereoscopio.

Los tubos de ensayo fueron preparados previamente, en su interior contenían un soporte de papel filtro doblado con un orificio en el centro, además del medio de microinjertación (Anexo 2, Figura 4g), líquido de MS (Murashige, 1962) suplementado con vitaminas White (1963) con la concentración de sacarosa de 45g/L ó 75g/L, según tratamiento (Tabla 3 y 4).

Cada plántula microinjertada se introdujo dentro de un tubo de ensayo haciendo pasar la raíz (Figura 4h) por el orificio del soporte que se encontraba dentro del tubo.

Los microinjertos realizados, se incubaron a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; intensidad luminosa 5180 lux y 70% de humedad relativa (Figura 4i).

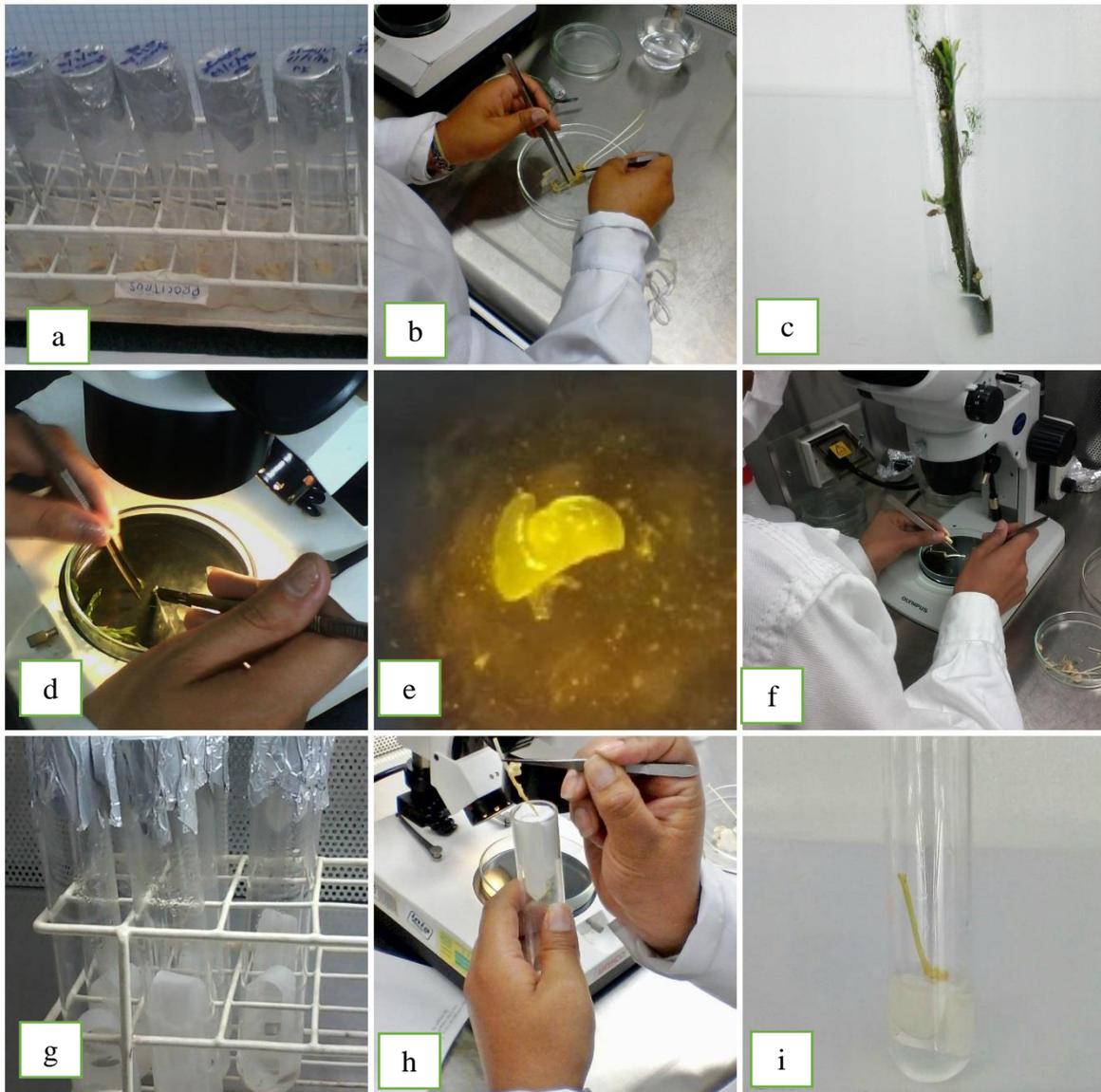


Figura 4: Proceso de microinjertación. a) Patrones; b) Decapitación del patrón; c) Vareta con brotes; d) Disección de brotes; e) Meristemo aislado de limón Eureka; f) Inserción del meristemo en el corte “T” del patrón; g) Medio de cultivo de microinjertación; h) Colocación de plántula microinjertada en el medio de cultivo; i) Microinjerto realizado.

FUENTE: Edición propia, 2017

Los microinjertos fueron distribuidos en un Diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA) con arreglo factorial de 6 tratamientos (las combinaciones resultantes de los factores “Concentración de sacarosa” y “Número de cotiledones del patrón”), con 3 repeticiones (Las repeticiones eran consideradas como Bloque), cada una con 10 unidades.

Se evaluó independientemente a cada especie (naranja Washinton Navel y Limon eureka).

Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, en los casos que resultó significativo el ANOVA, se aplicó la prueba comparativa Tukey a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).

Tabla 3: Tratamientos de la microinjertación de limón Eureka

ESPECIE		LIMÓN EUREKA					
FACTORES	[Sacarosa]	45			75		
	N° de cotiledones	2	1	0	2	1	0
TRATAMIENTOS (T)		T1	T2	T3	T4	T5	T6
REPETICIONES	REP 1	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u
	REP 2	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u
	REP 3	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u

FUENTE: Edición propia, 2017

u: Unidades

Tabla 4: Tratamientos de la microinjertación de naranja Wshington Navel

ESPECIE		NARANJA WASHINGTON NAVEL					
FACTORES	[Sacarosa]	45			75		
	N° de cotiledones	2	1	0	2	1	0
TRATAMIENTOS (T)		T1	T2	T3	T4	T5	T6
REPETICIONES	REP 1	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u
	REP 2	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u
	REP 3	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u

FUENTE: Edición propia, 2017

u: Unidades

Los tratamientos para cada especie de planta, se le identificó de la siguiente manera:

T1: Medio MS + 45 g/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones

T2: Medio MS + 45 g/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones

T3: Medio MS + 45 g/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones

T4: Medio MS + 75 g/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones

T5: Medio MS + 75 g/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones

T6: Medio MS + 75 g/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones

Las variables respuestas:

- *Porcentaje de prendimiento*: Se observó a los 14 días después de la microinjertación en algunos tratamientos el crecimiento del meristemo y a los 28 días, el desarrollo de algunas hojas. Por lo que a esta última fecha se decidió registrar los datos, para el porcentaje de prendimiento y para éste, se determinó la proporción entre los números de microinjertos prendidos, sobre el total de microinjertos realizados, multiplicado por el cien por ciento.
- *Desarrollo de número de hojas*: Se promedió el número de hojas desarrolladas de los microinjertos prendidos
- *Tamaño de hojas desarrolladas (mm)*: Se midieron las longitudes de las hojas desde la base de la inserción hasta el ápice del microinjerto desarrollado (Figura 5).
- *Porcentaje de hojas marchitas*: Se determinó la proporción entre los números de hojas marchita de los microinjertos prendidos, sobre el total de hojas desarrolladas de los microinjertos prendidos, multiplicado por el cien por ciento.

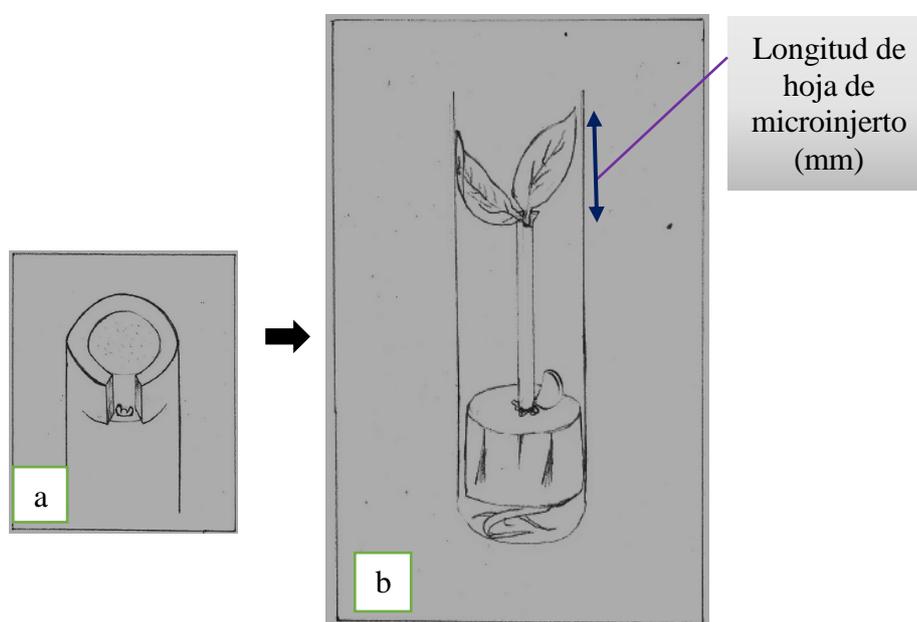


Figura 5: Medición de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos. a) Meristemo colocado en el corte "T invertido"; b) Medición de hoja del microinjerto desarrollado (la flecha bidireccional indica la forma de medición de las longitudes de hojas).

FUENTE: Edición propia, 2017

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS PORTAINJERTO CITRANGE TROYER EN CONDICIONES *IN VITRO*

La evaluación del porcentaje de germinación y contaminación de los ensayos preliminares de desinfección para semillas del portainjerto se realizó, después de un mes de la siembra, los datos se aplicaron en un DCA, y con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

Tabla 5: Porcentajes de contaminación, germinación y afecciones de semillas portainjerto sembradas en diferentes tratamientos

Tratamientos (T)	[NaClO] (%)	Tiempo (minutos)	%Contaminación	%Germinación	%quemados
Testigo	0.16	5	1.67 ^{AB§}	86.67 ^{B§}	0 ^{A§}
T1	0.08	5	30 ^B	63.33 ^B	0 ^A
T2	0.16	10	1.67 ^{AB}	10 ^{AB}	55 ^{AB}
T3	0.2	10	0 ^A	0 ^A	93.33 ^B
T4	0.8	10	0 ^A	0 ^A	100 ^B

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

FUENTE: Edición propia, 2017

De la realización de los ensayos de desinfección superficial de semillas del portainjerto, en la Tabla 5, se puede observar que el mejor tratamiento fue el tratamiento “Testigo”, aunque el “T2” obtuvo similar resultado en la contaminación (1,67 %), y se diferenciaron en el porcentaje de germinación (con el “Testigo” resultó 86.67%, mientras con el “T2” sólo el 10% de semillas germinaron) y en el porcentaje de quemados (en el “Testigo” no hubo ningún quemado, a diferencia del “T2” que 55% se quemaron).

Paniagua (2004), consiguió resultados similares con 0.5% y 0.4% de NaClO por 10 minutos, logrando en el mejor de los casos 90% de germinación con un mínimo de contaminación.

Sin embargo en el estudio de Rojas (2001), determinó un protocolo de desinfección superficial empleando mayor concentración (1%) de NaClO remojado por 10 minutos y

termoterapia, las semillas no se afectaron por el hipoclorito; para su germinación complementaron con fitohormonas porque sin ello se obtenía bajo porcentaje de germinación.

A comparación de la germinación obtenidas por Paniagua y Rojas, en el presente trabajo se logró una buena desinfección superficial de semillas a un menor costo (0.16% de NaClO) y tiempo (5 minutos de remojo). Sin embargo, las semillas de Citrange Troyer germinaron con variada vigorosidad y algunas sin raíz y en un tiempo de 2-3 meses. Cabe recordar que las semillas eran certificadas traídas de California y habían recibido un pretratamiento de conservación de termoterapia en agua de 52°C y de hidroxiquinolina. Además, casi todo el tiempo durante su uso se mantuvieron conservadas en refrigeración (2-4°C). Lo cual significaba que su viabilidad se conservaría por lo menos 6 meses (Villegas y Andrade, 2005).

No obstante, es importante considerar que la pérdida de viabilidad y capacidad de germinación dependen de la especie, porque existen algunos cítricos que presentan semillas recalcitrantes, y éstas no pueden resistir los efectos de la sequedad o temperaturas menores de 10° C; por tanto, no pueden ser conservadas por largo periodo de tiempo (Berjak y Pammenter, 2012). Esto indicaría que Citrange Troyer es un cítrico con semillas recalcitrantes y que el tiempo de conservación influyó negativamente y lo confirma Figueroa *et al.* (2003), en sus ensayos experimentales, las semillas Citrange germinaban hasta el 100% en corto tiempo (3-4 semanas de sembrado) cuando se conservaban sin frío, o en refrigeración (reduciendo en 20% la germinación, en un tiempo más largo y con baja vigorosidad), por lo que recomiendan la siembra inmediata a la obtención de semillas. Por otro lado, el vigor de la plántula también dependió de la constitución genética (Reynaga, 2006) que se le puede considerar como uno de los factores internos influyentes en el desarrollo de las semillas del portainjerto.

Ante esta limitación, Rojas (2001) empleó reguladores de crecimiento, BAP 2.0 mg/L, y AG3 2.0 mg/L para la inducción de brotes y AIB en 1.0 mg/L para el desarrollo de raíz de las semillas al cabo de un mes. Pero la aplicación de reguladores de crecimiento se requiere de un cuidadoso estudio y de tecnología, lo que implica mayor gasto económico y de tiempo.

Finalmente, el tratamiento testigo (0.16% de NaClO por 5 minutos) fue elegido como el tratamiento óptimo para el protocolo de desinfección superficial de semillas del patrón.

Por lo tanto el protocolo de desinfección superficial de semillas portainjerto consistió en remojar durante un minuto en alcohol 70°, luego en 0.16% de NaClO más tween 20 (dos

gotas por cada 100 ml) por 5 minutos, el cual permitió la óptima desinfección y logrando una adecuada germinación del portainjerto Citrange Troyer.

4.2. **EVALUACIÓN DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL Y SIEMBRA DE VARETAS PARA LA OBTENCIÓN DE MERISTEMOS**

La evaluación del porcentaje de contaminación y de quemados de varetas se realizó después de 10 días posteriores a la siembra, cuando ya habían desarrollado brotes de 2 cm aproximadamente. Los datos se analizaron mediante un DCA y se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

Según el análisis estadístico, los resultados presentados en la Tabla 6 (para varetas de limón Eureka) y tabla 7 (para varetas naranja Washington Navel), muestran que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos de desinfección superficial de las varetas sobre la variable porcentaje de contaminación, obteniéndose altos porcentajes de contaminación, el mejor tratamiento (T3: con 1% de NaClO por 20 minutos) presentó 85% y 73.15% de contaminados de varetas de limón Eureka y de naranja Washington Navel, respectivamente. Estos altos porcentajes de contaminación, también se ha reportado en muchos trabajos realizados, como en el de Vidal (2014), quien obtuvo 56% de contaminación de segmentos nodales (varetas de 1.3 cm) al emplear 0.67% de NaClO por 15 minutos, o como en el de Varela (2015) que al evaluar al tercer día de siembra ya había 50% de contaminados y al cumplir 7 días observó 100% de contaminación con hongos y bacterias, en todos los tratamientos (éstos contenían desde el 0.4 - 1.2% de NaClO, remojados por 15 minutos).

Posiblemente, la contaminación se debe a que las varetas proceden de plantas leñosas de condición adulta y estas plantas donadoras eran cultivadas directamente en el campo y se encuentran expuestas a muchos agentes contaminantes, además las varetas, no habían recibido pretratamientos adicionales como lo recibieron las semillas.

En la evaluación de porcentaje de quemados también se observó que el T3 no presentó ninguna vareta quemada en ambos tipos de cítricos, mientras que en el tratamiento T4 (con 1.5% de NaClO por 20 minutos) se obtuvo un 95% de varetas quemadas, una explicación del porque las varetas se quemaron, se debería a la dosis de NaClO la cual estaría relacionado a actividad de la enzima polifenol oxidasa, que se encuentra en plantas leñosas, aumenta su actividad a altas concentraciones de NaClO, porque cataliza la reacción entre

variados compuestos fenólicos y oxígeno molecular para producir quinonas, las cuales pueden inhibir el crecimiento e incluso causar la muerte celular de explantes cuando el tejido vegetal se ve afectado por lesiones internas, esto se demostró en el trabajo de Pequeño *et al* (2015), quienes encontraron que a una dosis de 3.24% del NaClO ocasionaba un aumento de la actividad de la enzima polifenol oxidasa en hojas y peciolo de *Jatropha curcas* cuando eran desinfectados superficialmente para un cultivo *in vitro*, provocando una oxidación fenólica, por presencia de lesiones en el tejido vegetal, manifestándose con una coloración oscura, pardeamiento de los tejidos.

Analizando los resultados de la producción de brotes, nuevamente se identificó que el tratamiento T3 fue el mejor, ya que se obtuvo mayor cantidad de brotes (3 brotes en promedio). Esto tiene relación con la menor contaminación y menor porcentaje de varetas quemadas.

Tabla 6: Porcentaje de contaminación de quemados y producción de brotes de las varetas de limón Eureka en diferentes tratamientos de desinfección superficial

Tratamiento (T)	(NaClO (%)/Tiempo (min))	Unidades experimentales	Contaminación de varetas (%)	Quemados (%)	Promedio del N° de brotes por vareta
Testigo	0.88/10	10	96.67 ^{A§}	0 ^{A§}	1.67 ^{AB§}
T1	0.70/10	10	100.00 ^A	0 ^A	0.67 ^A
T2	0.88/20	20	93.33 ^A	0 ^A	2 ^{AB§}
T3	1.00/20	20	85.00 ^A	0 ^A	3.67 ^B
T4	1.50/20	20	95.00 ^A	95 ^B	1 ^A

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

FUENTE: Edición propia, 2017

Tabla 7: Porcentaje de contaminación de quemados y producción de brotes de las varetas de naranja Washington Navel en diferentes tratamientos de desinfección superficial

Tratamiento (T)	(NaClO (%)/Tiempo (min))	Unidades experimentales	Contaminación de varetas (%)	Quemados por NaClO (%)	Promedio del N° de brotes por vareta
Testigo	0.88/10	20	96.67 ^{A§}	0 ^{A§}	1.67 ^{AB§}
T1	0.70/10	20	100.00 ^A	0 ^A	0 ^A
T2	0.88/20	20	91.67 ^A	0 ^A	1.33 ^{AB}
T3	1.00/20	20	74.33 ^A	0 ^A	3.33 ^B
T4	1.50/20	20	90.00 ^A	100 ^B	0 ^A

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

FUENTE: Edición propia, 2017

Por otro lado, las varetas sin contaminación, y sin ser quemadas se desarrollaron mejor y con mayor número de brotes.

Tomando en cuenta los resultados preliminares de desinfección de varetas, el tratamiento T3 (1% de NaClO por 20 minutos) fue elegido para el desarrollo del protocolo de desinfección superficial y siembra de varetas para la obtención de yemas, y a pesar de los valores altos de contaminación de los explantes, se pudo extraer yemas que se ubicaban en la parte superior de la vareta contaminada.

Por lo tanto, el protocolo de desinfección superficial de varetas consistió en la aplicación de alcohol 70° por un minuto y una solución de 1% de NaClO más tween 20 (dos gotas por cada 100 ml) por 20 minutos, con 85% de contaminación en plantas donadoras provenientes del campo.

4.3. MICROINJERTACIÓN

4.3.1. PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO

La evaluación del porcentaje de prendimiento se realizó después de 28 días de la microinjertación, porque a los 14 días se observaba desarrollo de callo y en algunos tratamientos, el crecimiento del ápice meristemático injertado, y al cabo de 28 días se observó mejor el desarrollo de hojas de los microinjertos. Los datos resultantes se analizaron en un DCA como se describió en la metodología. Luego se realizó la prueba de comparación de Tukey para el factor concentración de sacarosa sobre el prendimiento de microinjertos, a un nivel de 95% de confianza.

a. Porcentaje de prendimiento de microinjertos de limón eureka

En la Figura 6, se presentan los resultados de porcentaje de prendimiento de limón Eureka, en el cual se observa diferencia significativa estadísticamente (p -valor <0.05) entre los tratamientos de 45g/L de sacarosa (con un 13.33% de prendimiento) y los de 75g/L de sacarosa (4.44% de prendimiento). Pero no se reportó diferencia significativa entre los tratamientos con “factor número de cotiledones”; tampoco hubo en la interacción entre los dos factores (concentración de sacarosa y número de cotiledones) en estudio.

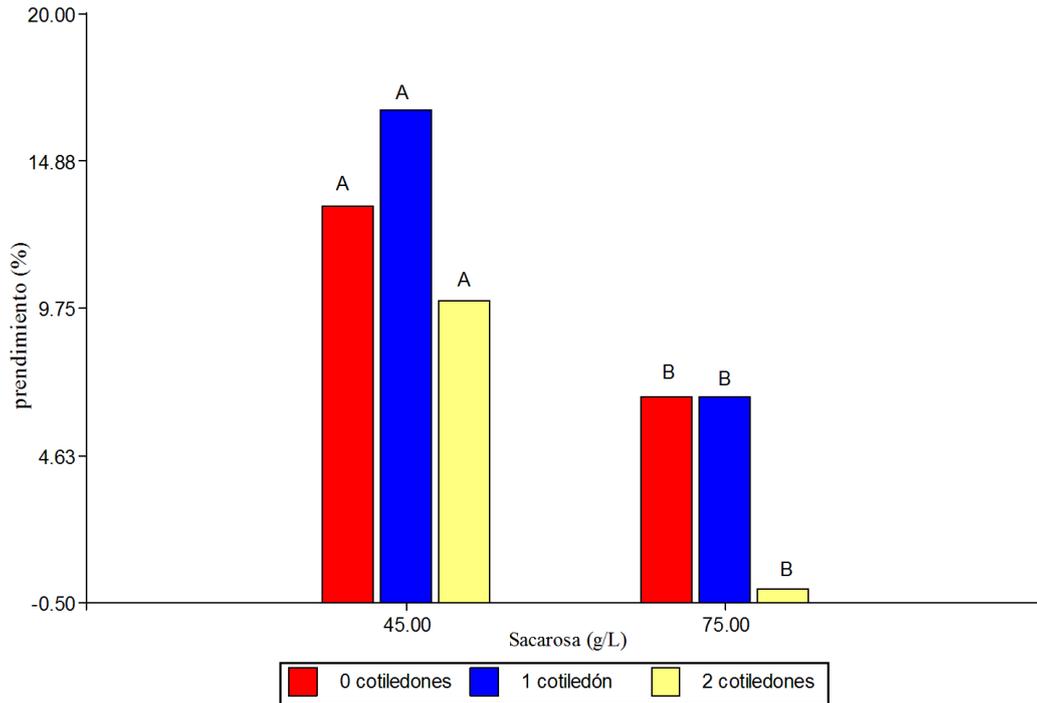


Figura 6: Porcentaje de prendimiento de limón Eureka

FUENTE: Edición propia, 2017

Dentro de los tratamientos con 45g/L de sacarosa, el tratamiento que correspondía al uso de 45g/L de sacarosa y un cotiledón del portainjerto (Tratamiento 2) resultó con mayor porcentaje de prendimiento que todos los tratamientos, con un 16.67% de prendimiento promedio.

En los resultados de microinjertación realizados por Navarro (1979), la concentración de 75g/L de sacarosa influyó positivamente en el éxito del injerto, obteniendo desde un 30% hasta 90% de prendimiento de ápices de naranjos, de mandarino, de pomelos y de qumKuats sobre el patrón Citrange Troyer. También, Naz *et al.* (2007), obtuvo 17% más microinjertos a un nivel de sacarosa del 70g/L, que a un 30g/L de sacarosa en el medio de cultivo.

A diferencia de estos resultados, en el presente trabajo, los tratamientos con 45g/L presentaron mejor prendimiento, que 75g/L de sacarosa en el medio. Esto puede deberse porque la sacarosa a altas concentraciones en el medio de cultivo, se comporta como un agente osmótico por un tiempo, ya que luego es metabolizada por la planta (CIAT, 1991), provocando deshidratación temporal en toda la planta patrón y pudo verse afectado el meristemo, interfiriendo en el prendimiento.

El bajo porcentaje de prendimiento de limón Eureka se debe a que presenta problemas de afinidad con el portainjerto Citange Troyer; a diferencia de naranja Washington Navel que es más compatible con aquel patrón (García *et al.*, 2003 y Navarro, 1988) y por lo que se obtuvo más microinjertos prendidos.

Jonard *et al.* (1983) consiguieron 21.7% de prendimiento aplicando 40% (w/v) de sacarosa, considerando a la microinjertación como una técnica difícil, por lo que realizaron un pretratamiento a los brotes apicales injerteras con 0.1mg/L de zeatina antes de realizar la inserción sobre el patrón, de este modo obtuvo un aumento de injertos exitosos (64%). También, Edriss y Burguer (1984), logró duplicar su tasa de éxito de prendimiento empleando fitohormonas, alcanzando hasta 75.4% de prendimiento cuando remojaron los brotes de toronja Star Ruby por cinco minutos en 10mg/L de 2,4-D antes de la colocación en la incisión del T invertido del patrón en el proceso de la microinjertación *in vitro* o 66.6% cuando remojaron en 1mg/L de Kinetina.

La aplicación o remojo en reguladores de crecimiento a los meristemas, es una opción que se podría optar, aunque esto implicaría mayor estudio para la comprensión sobre funcionalidad de los fitorreguladores.

En la Figura 7, se pueden apreciar algunos microinjertos prendidos de limón Eureka de algunos tratamientos.

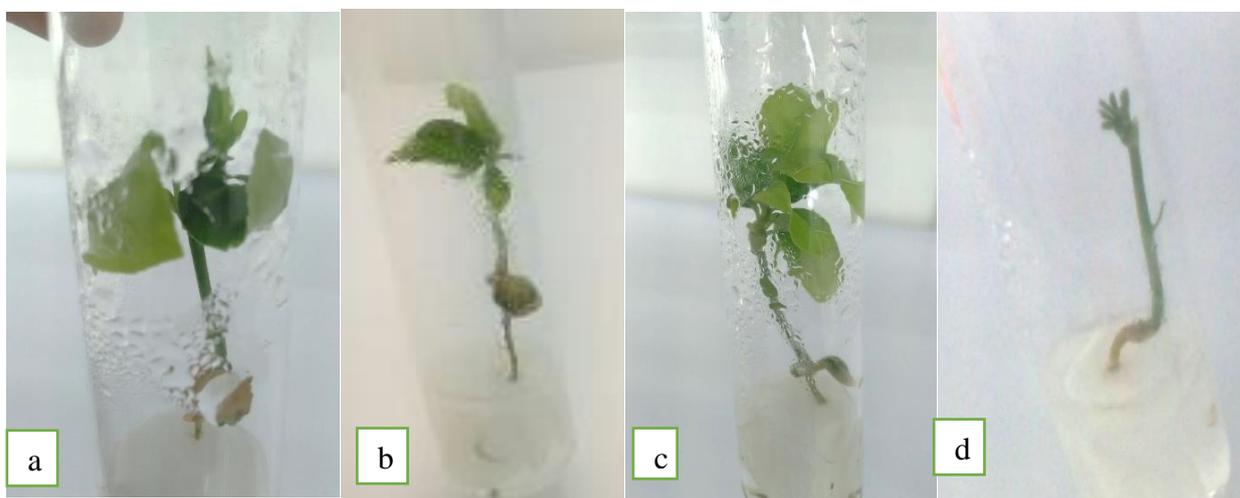


Figura 7: Microinjertos prendidos de limón Eureka. a) Tratamiento 1 (45g/L sacarosa con 2 cotiledones); b) Tratamiento 2 (45g/L sacarosa y 1 cotiledón). c) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa y 1 cotiledón); d) Tratamiento 6 (75g/L sacarosa y 0 cotiledones).

FUENTE: Edición propia, 2017.

b. Porcentaje de prendimiento de microinjertos de naranja Washington Navel

En cuanto a los resultados obtenidos en el prendimiento de la especie naranja Washington Navel existe diferencia significativa sólo por efecto de número de cotiledones (p -Valor <0.05), esto se puede observar en la Figura 8; también se evidenció que no existe interacción entre los dos factores (concentración de sacarosa y número de cotiledones) de estudio.

Se obtuvieron mejores resultados con los tratamientos con un portainjerto de 0 cotiledones (26.67% de prendimiento), en comparación con los tratamientos que correspondía el uso de portainjerto con un cotiledón (16.67% de prendimiento) o dos cotiledones (11.67% de prendimiento).

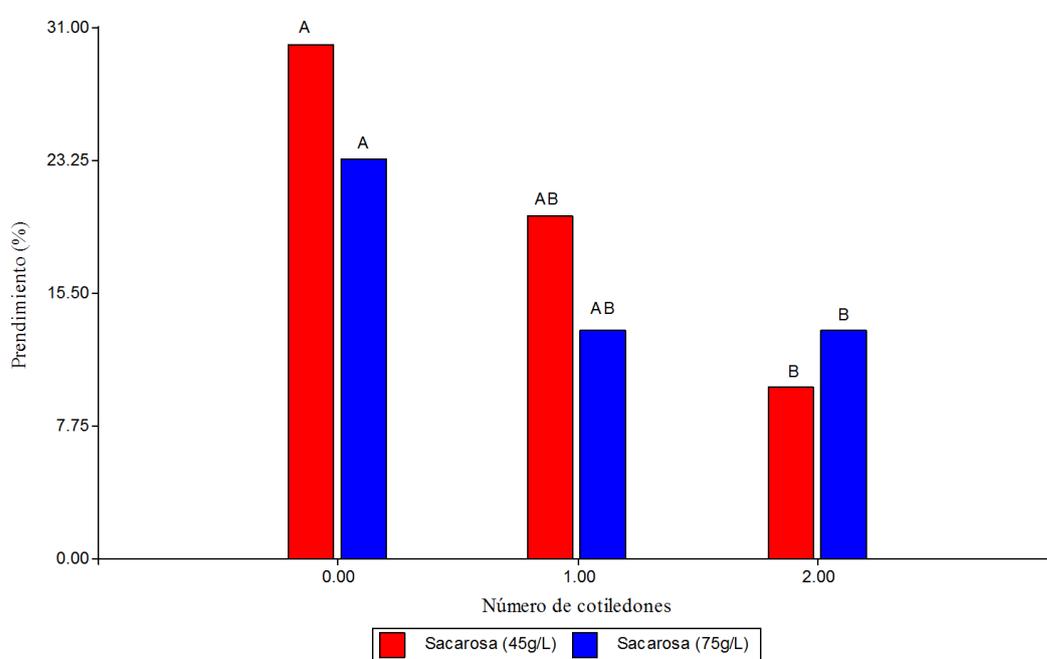


Figura 8: Porcentaje de prendimiento de naranja Washington

FUENTE: Edición propia, 2017

Esto no coincide con los resultados de Navarro (1979) quien no encontró diferencia significativa en cuanto al tratamiento con diferentes números de cotiledones del patrón, pero afirmó que observó mayor brotación de yemas axilares del patrón en los microinjertos con cotiledones. Lo que posiblemente significaría que la presencia de los cotiledones en los microinjertos indujeron la brotación de yemas axilares del patrón e interfiriendo en el prendimiento, observándose bajo porcentaje de éxito en los microinjertos con cotiledones.

Esto porque, los cotiledones tienen un papel importante en la germinación de las semillas, y la formación de las primeras hojas ya que éste proporciona ácido giberélico durante el proceso de germinación (Velasco, 2013), pero en esta situación, principalmente sirvió como reserva de alimento, ya que inicialmente hay mucha concentración de sacarosa y se está comportando como agente osmótico.

La decapitación de la parte apical del epicótilo del patrón interfirió en el prendimiento de todos los tratamientos sin excepción, obteniéndose como resultados bajos porcentaje de prendimiento tanto en los microinjertos de limón Eureka o como de naranja Washington Navel, al decapitar la parte apical se pierde la dominancia apical y se promueve el crecimiento de brotes axilares del patrón (Lluna, 2006).

No se identificó diferencia significativa entre los tratamientos con factor concentración de sacarosa. Pero a simple vista, se puede ver que los tratamientos con menor concentración de sacarosa presentaban mayor prendimiento que los de mayor concentración.

El tratamiento (T3) que correspondía al uso de 45g/L y 0 cotiledones fue mejor que todos los tratamientos realizados para los microinjertos de naranja Washington Navel, alcanzando el 30 % de prendimiento.

Si bien es cierto que existe mayor compatibilidad entre el patrón Citrange con la naranja, como ya se mencionó anteriormente, pero pueden verse afectados por la temporada en que se realiza la microinjertación. Jonard *et al.* (1983). Esto indica la importancia de la época de muestreo de las varetas para la obtención de ápices, para el caso de varetas de naranja Washington Navel después de la época de cosecha que en Perú se realiza a mediados de mayo, junio, julio, setiembre; para el caso de limón Eureka la cosecha se realiza a lo largo del año, debido a que hay otros factores edafoclimáticas que intervienen en la cosecha de frutos.

La destreza del microinjertador, la rapidez con que preparó el patrón, aisló el ápice y realizó el microinjerto, evitando la deshidratación en ambos tejidos; coincidiendo de este modo con los resultados reportados por Hernández, (1996) son otras de las razones por las cuales se pudo disminuir el porcentaje de éxito de prendimiento de microinjertos de naranja Washington Navel.

La morfología de los meristemas, es un factor que puede influir. Un estudio realizado en Francia sobre los meristemas de *Arabidopsis thaliana*, mencionan que la estructura del meristemo no cambia (3 zonas central, superior y periféricas), pero morfológicamente sí, la

especie basal de *Arabidopsis* contiene el gen *clv3* mientras, las mutadas presentan sobreexpresión o poca expresión de ese gen, cambiándole a una forma de mayor volumen, achatada o alargada (Mandel *et al.*, 2016). En el presente trabajo, se encontraba que limón Eureka presentaba un meristemo más pequeño y fácilmente se identificaba, lo cual permitía realizar más rápido y con menos manipulación en la inserción en el corte “T invertido”, a diferencia de naranja Washington Navel que, recordar que es una especie mutada, presentaba un meristemo de mayor volumen algo achatado, y se realizó la microinjertación con mayor cuidado y tiempo tanto en la disección de primordios y el inserción.

En la Figura 9 se muestra microinjertos prendidos de naranja Washington Navel con diferentes tratamientos.

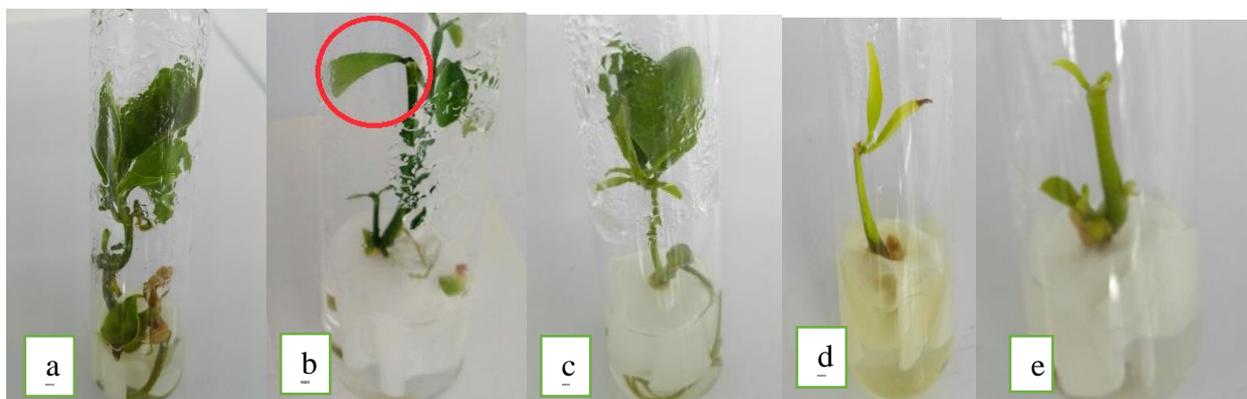


Figura 9: Microinjertos prendidos de naranja Wshington Navel a) Tratamiento2 (45g/L sacarosa y 1 cotiledón). b) Tratamiento 3 (45g/L sacarosa y 0 cotiledones). c) Tratamiento 4 (75g/L sacarosa y 2 cotiledones). d) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa y 1 cotiledón). e) Tratamiento 6 (75g/L sacarosa y 0 cotiledones).

FUENTE: Edición propia, 2017.

Otros factores a tomarse en cuenta es el grado de estrés que se le pueda producir al meristemo o al patrón durante la microinjertación; así como también la edad del patrón (Navarro, 1988), la humedad relativo, es importante controlar preciso de humedad (70°), esto es difícil de conseguirlo a largo tiempo, un estado de desecación, provocaría la inhibición de crecimiento de la planta (Barbee *et al.*, 1973).

En conclusión, existe muchos factores externos como internos que no se pueden o son difíciles de controlar que influyen en la microinjertación in vitro de meristemos caulinares favoreciendo o dificultando el éxito del prendimiento.

4.1.1. NÚMERO DE HOJAS DESARROLLADAS EN LOS MICROINJERTOS PRENDIDOS

El desarrollo de hojas en los microinjertos se identificaron por ser unifoliadas, que se dispusieron en forma de roseta, además de la coloración verde claro (para limones Eureka) y verde regularmente oscuro (para naranja Washington Navel), considerándose sí como microinjerto exitoso.

Para el análisis de la variable “número de hojas desarrolladas” se consideró como una unidad experimental a cada uno de los microinjertos exitosos obtenidos luego de 63 días de realizada la microinjertación.

a. Número de hojas desarrolladas de los microinjertos de limón Eureka

Los microinjertos prendidos de limón Eureka se distribuyeron en un DCA, mediante la ejecución de la prueba Paramétrica de ANOVA, 5 tratamientos, con 2 repeticiones (se tomó como referencia el menor valor de microinjertos prendidos).

El tratamiento T4 (de la combinación de los factores: 75g/L de sacarosa y 2 cotiledones) no fue evaluado, debido que en éste tratamiento no hubo ningún prendimiento.

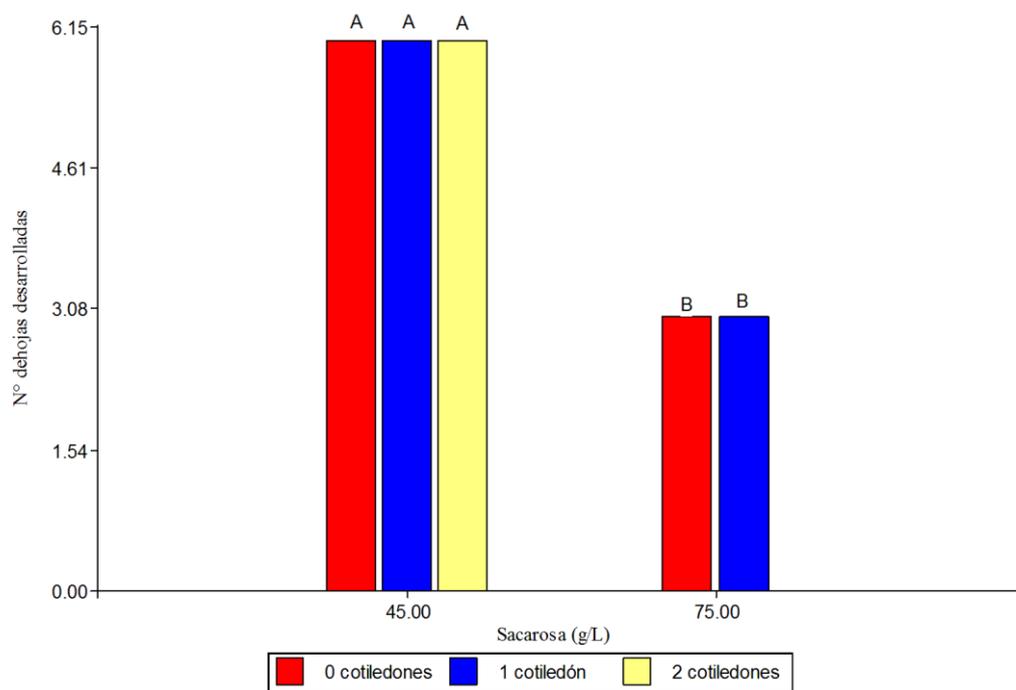


Figura 10: Número de hojas desarrolladas de los microinjertos limón Eureka

FUENTE: Edición propia, 2017

Los datos representados en la Figura 10 corresponden al número de hojas desarrolladas por el microinjerto limón Eureka, a los 63 días. Se observa que hay diferencia significativa entre los tratamientos del factor concentración de sacarosa de los microinjertos de limón Eureka, aplicándose la prueba comparativa Tukey a un nivel de confianza de 95%.

Se ha obtenido 6 hojas promedio desarrolladas del ápice meristemático de los microinjertos tratados con 45g/L de sacarosa y 3 hojas promedio desarrolladas en los tratamientos con 75g/L de sacarosa.

El número de hojas desarrolladas no fue influenciada por el número de cotiledones, obteniéndose entre 4.5 a 6 hojas promedio, sin mostrar diferencias significativas.

Los resultados obtenidos son contrarios a los obtenidos por Navarro *et al.* (1975) y Pierik (1987) afirmaron que la concentración de sacarosa influye en el desarrollo de hojas de los microinjertos prendidos, a 75g/L de sacarosa en el medio de cultivo promueven el aumento progresivo de nuevas hojas. Posiblemente, podría deberse a la influencia del factor importante que es el buen desarrollo de vascularización entre el meristemo y el patrón para que haya un buen flujo de nutrientes y de hormonas (como auxinas y citoquininas), y así se favorezca el desarrollo de hojas de los microinjertos.

b. Número de hojas desarrolladas en los microinjertos de naranja Washington Navel

Para el caso de los microinjertos de naranja Washington Navel; los resultados también fueron analizados mediante la ejecución de la prueba Paramétrica de ANOVA, los tratamientos se generaron al combinarse 2 concentraciones de sacarosa (45 y 75 g/L) y 3 niveles de número de cotiledones del portainjerto (0, 1 y 2). Distribuidos en un Diseño Completamente al Azar (DCA), 6 tratamientos y 3 repeticiones, con arreglo factorial. Los datos fueron evaluados en un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).

Los resultados mostraron que se obtuvieron entre 2 a 5 hojas promedio provenientes del ápice meristemático de los microinjertos de naranja Washington Navel y estadísticamente no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos por concentración de sacarosa o número de cotiledones del portainjerto (Figura 11).

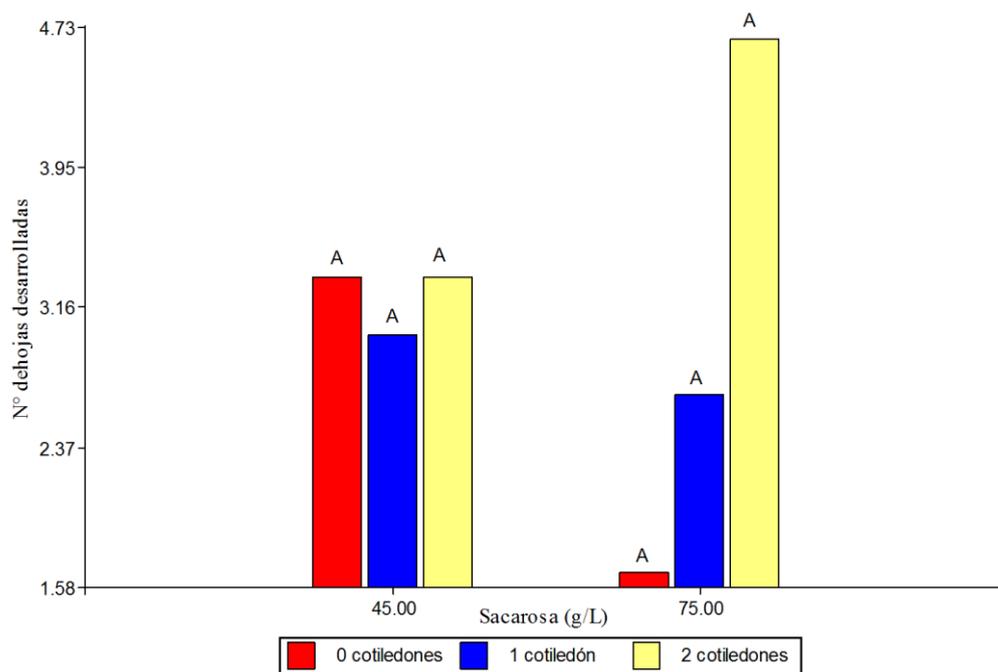


Figura 11: Número de hojas desarrolladas de los microinjertos de naranja Washington Navel

FUENTE: Edición propia, 2017

No obstante, el desarrollo de hojas de los microinjertos obtenidos en los resultados del número de hojas desarrolladas en los microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel del presente trabajo se ve justificada por el fundamento planteado de Agusti (2003), en donde sostiene que este hecho se basa en la actividad celular y propone que la microinjertación se debe realizar a condiciones climáticas adecuadas con una temperatura media que puede encontrarse entre 15- 30°C, este aspecto atañe a la idoneidad de la época de las variedades a microinjertar, es decir, se debe efectuarse cuando la actividad cambial garantice la unión del microinjerto, y lo bastante baja como para impedir la brotación de yemas del patrón, de este modo se lograría más injertos exitosos y mejor desarrollo de hojas a partir del ápice meristemático. En el presente trabajo los microinjertos se conservaron en un cuarto de incubación de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, encontrándose dentro del intervalo, pero acercándose a 30°C , posiblemente pudo interferir en el desarrollo de las hojas de todos los microinjertos.

Así también, Gamboa (2015) considera que la humedad (70%), es muy importante porque permite mantener turgentes a todas las células vegetales de las hojas desarrolladas de los microinjertos, además de favorecer la formación del callo del injerto.

Estos factores también, podrían explicar porque el número de hojas de los microinjertos en Washington Navel no resultó mayor que los microinjertos de limón Eureka, a pesar de presentar mejor compatibilidad con el patrón Citrange Troyer (García *et al.*, 2003). Además, cabe mencionar que la época de recolección para naranja Washington Navel se realizó en julio, encontrándose fuera de época para su brotación de yemas vegetativas y cuando se diseccionó para obtener meristemos aislados, se encontraron de vez en cuando yemas florales.

4.1.2. TAMAÑO DE LAS MICROINJERTOS

La evaluación de tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel se realizó después de 63 días de la microinjertación realizada.

Para el análisis de la variable “tamaño de hojas desarrolladas” de igual modo que la anterior variable se consideró como una unidad experimental a cada uno de los microinjertos exitosos obtenidos luego de 28 días de realizado la microinjertación. Los tratamientos se distribuyeron en un DCA mediante la ejecución de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, 6 tratamientos y 3 repeticiones, aun nivel de confianza 95% ($\alpha=0.05$).

Sin embargo, para el caso de limón Eureka el tratamiento 4 no fue evaluado porque en éste no se obtuvo microinjertos prendidos.

Los datos obtenidos de longitudes de hojas de los microinjertos prendidos se clasificaron en intervalos empleando una adaptación de la regla de Sturges (1926), con el fin de conseguir los intervalos de tamaño, para efectuar las comparaciones posteriores:

Considerándose de que se obtuvo una medida de 1mm de la longitud más pequeña, y 34mm como la longitud más grande de las hojas de los microinjertos prendidos, y que son de los 6 tratamientos evaluados.

$$\text{Alcance} = [l_i, l_{i+1}] = [1, 34]$$

$$R = X_{\max} - X_{\min} = 34\text{mm} - 1\text{mm} = 33\text{mm}$$

$$K = 1 + 3.322 \log(n) = 1 + 3.322 \log(6) = 3.58$$

Se tomó el valor 3 (K=3) para que la amplitud de cada intervalo (d) sea de valor exacto.

n=número de tratamientos.

$$X_i = [l_i + l_{i+1}] / 2$$

$$d = R/K = 33/3 = 11$$

Tabla 8: Intervalo de clasificación para determinación del tamaño de hojas de microinjertos prendidos

Tamaño	intervalo (mm)
Hojas pequeñas	[1, 12>
Hojas medianas	[12, 23>
Hojas grandes	[23, 35]

FUENTE: EDICIÓN PROPIA, 2017.

a. Tamaño de hojas desarrolladas de los microinjertos de Limón Eureka

En la evaluación de tamaño de hojas en los tratamientos de microinjertos prendidos de limón Eureka con respecto al factor número de cotiledones del patrón, a simple vista en los tratamientos con patrones que tienen dos cotiledones se obtuvieron más de hojas grandes (58.57%), luego le seguiría los tratamientos con un cotiledón (51.43 %) y por último los tratamientos con cero cotiledones (12.5%). Pero, estadísticamente no hubo diferencia significativa (p-valor > 0.05). Lo mismo ocurrió con el factor concentración de azúcar no se tuvo diferencias significativas entre los tratamientos: Los tratamientos con 45g/L de sacarosa en el medio presentaron 50% de hojas grandes y los tratamientos con 75g/L, presentaron 40% de hojas grandes.

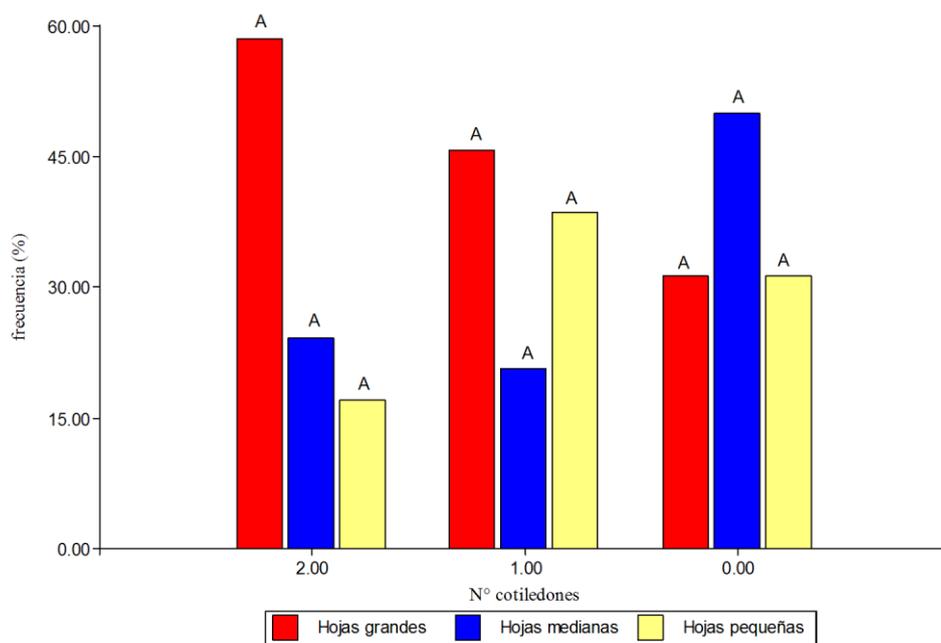


Figura 12: Tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka – Número de cotiledones

FUENTE: Edición propia, 2017

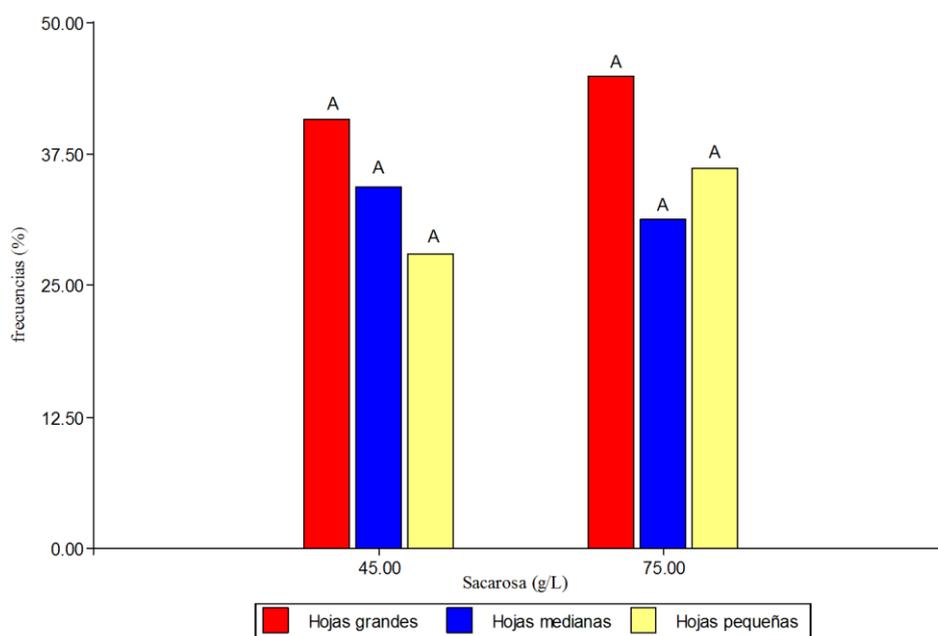


Figura 13: Tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka – Concentración de sacarosa

FUENTE: Edición propia, 2017.

Estos resultados concuerdan con las conclusiones obtenidas por Navarro (1979). Esto puede deberse a que la planta absorbe los nutrientes principalmente del medio de cultivo porque la sacarosa se metabolizó y sirve como fuente de energía, y ya no es necesaria la presencia de los cotiledones para el desarrollo de la planta microinjertada.

En conclusión el factor número de cotiledones y la concentración de sacarosa no influenciaron sobre el tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka, obteniéndose hojas desde 2mm a 35mm de longitud independientemente de estos dos factores. (Figura 12 y figura 13).

b. Tamaño de hojas desarrolladas de los microinjertos de naranja Washington Navel

Los resultados de los tratamientos con diferentes número de cotiledones del patrón en los microinjertos de naranja Washington Navel (Figura 14), aparentemente se puede observar que los tratamientos con un cotiledón son mejores debido a que presentan más hojas grandes (31.94% hojas grandes), que en los tratamientos con dos cotiledones (7.94% de hojas grandes) o con cero cotiledones (0% de hojas grandes).

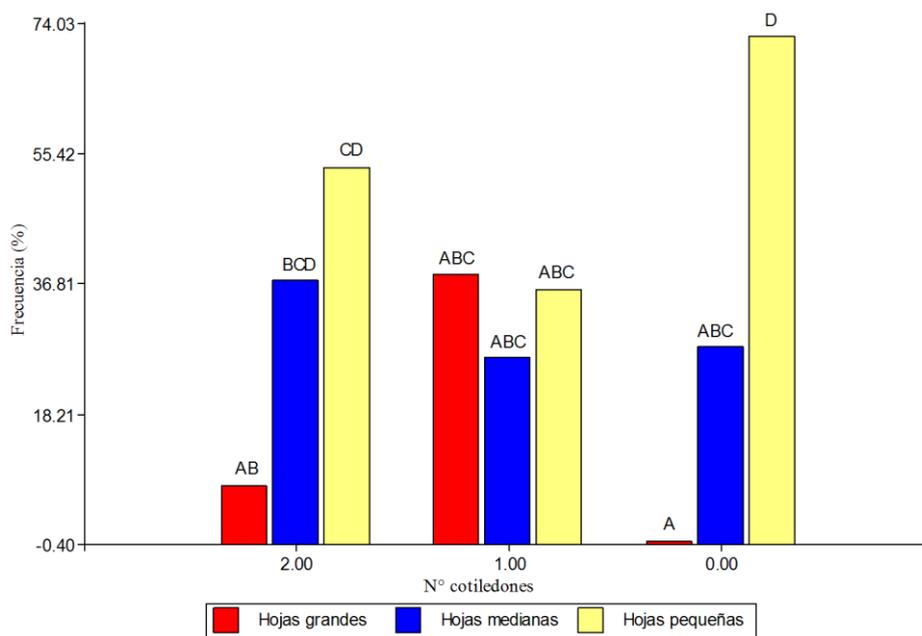


Figura 14: Tamaño de hojas de los microinjertos y naranja Washington Navel- Número de cotiledones

FUENTE: Edición propia, 2017.

Sin embargo, no se puede afirmarse totalmente lo afirmado, porque estadísticamente, no se observa diferencia significativa. Se puede afirmar que en cada tratamiento se presentan más hojas pequeñas (2-12mm) que hojas grandes (23-35mm). En los tratamiento con 2 cotiledones se obtuvo 53.44% de hojas pequeñas, en los tratamientos con un cotiledón se tuvo 36.11% y en el tratamiento con cero cotiledones fue 72.22%. Nuevamente se reafirmaría, que el tamaño de las hojas de los microinjertos es independiente del factor número de cotiledones.

Similarmente, en la evaluación de la influencia del factor concentración de sacarosa sobre el tamaño de hojas de los microinjertos de naranja Washington Navel, no se observa diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 15), pese a que el tratamiento con 45g/L de sacarosa haya presentado 21.3% de hojas grandes y los tratamientos con 75g/L de sacarosa, desarrollaron más hojas pequeñas (6.17% de hojas grandes). Por lo tanto, esto también se debería a que la planta en todos los tratamientos se toma los nutrientes principalmente del medio de cultivo porque la sacarosa ya metaboliza y es suficiente para el desarrollo de las hojas.

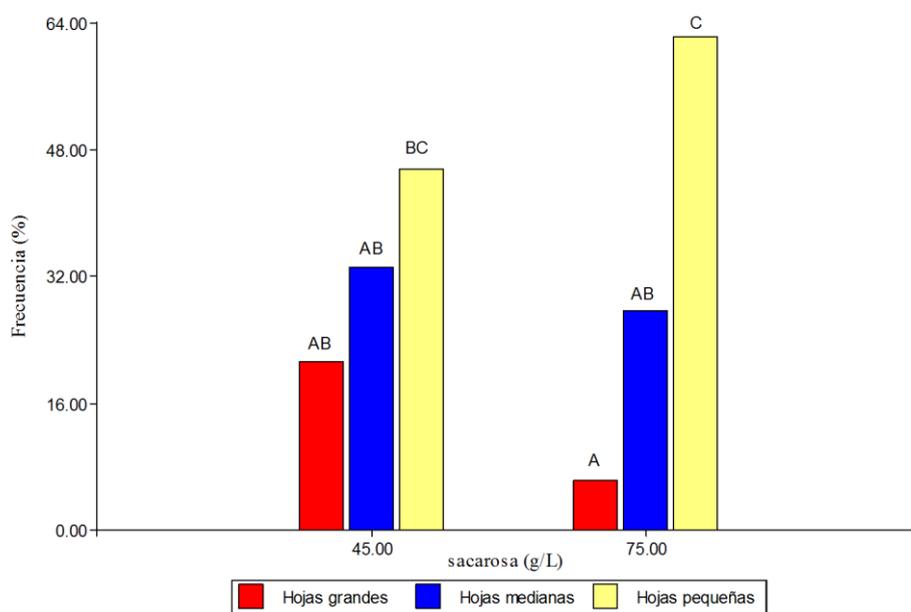


Figura 15: Tamaño de hojas de los microinjertos y naranja Washington Navel- concentración de sacarosa

FUENTE: Edición propia, 2017

Como una observación adicional se puede mencionar que en todos los microinjertos (de Washington Navel y de limón Eureka) que prendieron rápidamente y desarrollaban más de 1 hoja, no hubo formación de yemas axilares del patrón. Posiblemente el rápido prendimiento permitió la predominancia del desarrollo del ápice meristemático, pero este hecho sucedió en pocos microinjertos. Porque los brotes del patrón representan una competencia contra el injerto, al que le resta vigor y retarda el desarrollo (Morin *et al.*, 1980). En la mayoría de los microinjertos se observó la predominancia del desarrollo de brotes laterales del patrón, y esto porque inicialmente se cortó la dominancia apical (a la hora de realizar la decapitación del patrón) y esto estimuló el desarrollo de brotes laterales.

Por otro lado, Castle (1978), menciona que muchas plántulas obtenidas mediante microinjerto *in vitro* pueden crecer con adición de Ácido Giberélico, además de Auxina, porque la giberelina potencia el efecto de aquella fitohormona. Y gracias a las auxinas se logra formar el sistema vascular del meristemo que entrará en contacto con la del patrón. Sin embargo, aún se está lejos de entender esta interacción en el control del crecimiento

Ponpeu (1980), sostiene que además es necesaria la presencia de azúcar para la inducción de crecimiento, y que la concentración de azúcar (15 a 25g/L) causa formación de xilema; la alta concentración (30 a 40g/L) causa formación del floema, y las concentraciones intermedias (25-30 g/L) inducen por lo general xilema y floema con cambium entre ambos. En la presente investigación se empleó 45g/L y 75g/L de sacarosa, la cual es considerada como alta concentración, y en consecuencia se haya formado floema y casi nada de Xilema, causando un desbalance en el sistema vascular y afectando el desarrollo de las hojas.

4.1.3. **HOJAS MARCHITAS DE LOS MICROINJERTOS**

La presencia de hojas marchitas en los microinjertos de limón Eureka y naranja Washington Navel se evaluó a los 63 días de la microinjertación.

a. Hojas marchitas de los microinjertos de limón Eureka

Para la especie limón Eureka los tratamientos se generaron al combinarse los factores de concentraciones de sacarosa (45 y 75 g/L) y número de cotiledones del portainjerto (0, 1 y 2), se tomó como base al menor número de microinjertos y mejores datos obtenidos; sin embargo el tratamiento T4 (de la combinación de los factores: 75g/L de sacarosa *2

cotiledones) no fue evaluado, debido a que en éste tratamiento no hubo ningún prendimiento. Los datos se distribuyeron en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial, mediante la prueba Paramétrica de ANOVA, a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).

En la Figura 16, se presenta una gráfica de comparación múltiple de la prueba comparativa Tukey para el variable porcentaje de hojas marchitas, donde se puede observar que los tratamientos con mayor concentración de sacarosa (75g/L) en el medio de cultivo de microinjertación presentan más hojas marchitas, cloróticas o caída de hojas. Con lo cual, el factor concentración de sacarosa influencia en el desarrollo óptimo de hojas de los microinjertos.

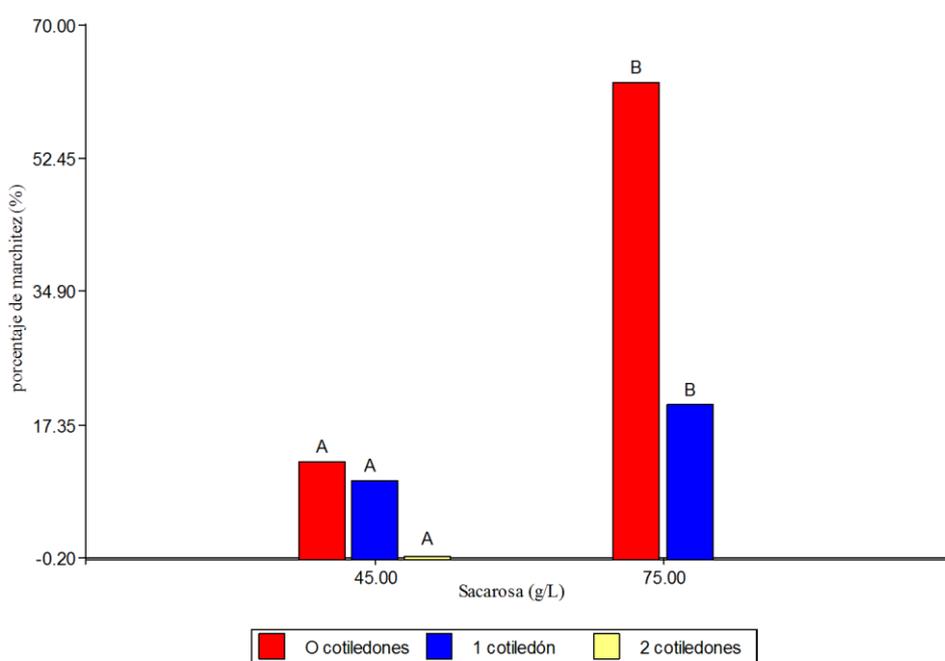


Figura 16: Hojas marchitas en los microinjertos de limón Eureka

FUENTE: Edición propia, 2017

b. Hojas marchitas de los microinjertos de naranja Washington Navel

Para evaluar las hojas marchitas de los microinjertos de naranja Washington Navel, los tratamientos se generaron al combinarse 2 concentraciones de sacarosa (45 y 75 g/L) y 3 niveles de número de cotiledones del portainjerto (0, 1 y 2). Los datos se distribuyeron en un Diseño Completamente al Azar (DCA), a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).

No se evidenció diferencia significativa en ninguno de los factores, tampoco por la interacción (Figura 17), aunque el promedio de hojas marchitas de los tratamientos con 45g/L de sacarosa presentan el 30 % de marchitez y el tratamiento con 1 cotiledón no presentó marchitez, en comparación con los tratamientos de 75g/L de sacarosa presentan el 50%.

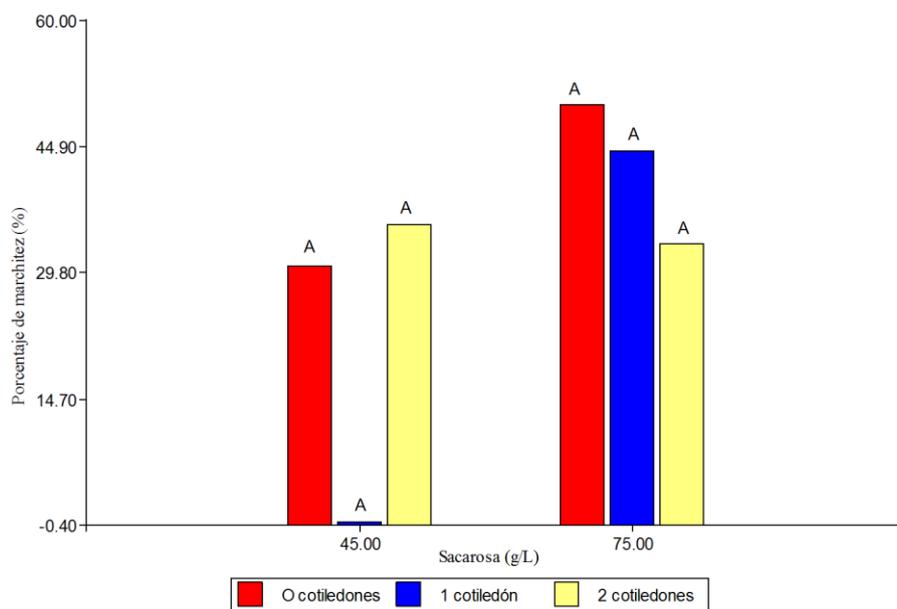


Figura 17: Hojas marchitas en los microinjertos de naranja Washington Navel

FUENTE: Edición propia, 2017

Morin *et al.* (1980), desde el punto de vista fisiológico, afirma que los brotes del patrón tienen más posibilidades de desarrollarse y, pueden ser la causa de la decadencia de los microinjertos. Pues recomiendan el desbrotamiento, además de quitar una parte aérea del patrón. Esto demuestra que la marchitez se debió a la predominancia de la generación de los brotes del patrón e impidiendo el desarrollo de los microinjertos. Por consiguiente, cabe mencionar que las hojas de los microinjertos presentaban una coloración más clara que las del patrón, esto posiblemente fue causado por una clorosis. Como (Carvajal, 1960) define el síntoma típico de la deficiencia de nitrógeno se visualiza temprano en las hojas; por una disminución en la formación de clorofila (amarillamiento de las hojas), a su vez los aminoácidos son precursores de las cadenas de proteínas y por lo tanto también se dificultan actividades enzimáticas, además de ser componente, de paredes celulares. Carvajal indica

que los síntomas se extienden rápidamente, por tratarse de un nutriente muy móvil, hacia las hojas jóvenes.

En resumen, de los resultados analizados cabe una afirmación tentadora que los efectos de los factores sobre el número, tamaño y marchitez de hojas desarrolladas de los microinjertos presentarían una relación directa entre los factores, a mayor número de hojas desarrolladas, resultó mayor tamaño de hojas y menor porcentaje de marchitez.

V. CONCLUSIONES

Objetivo 1:

- El mejor tratamiento de desinfección superficial de semillas del portainjerto fue 0.16% de NaClO (tratamiento testigo) por 5 minutos.

Objetivo 2:

- El mejor tratamiento de desinfección superficial de varetas fue cuando se empleó 1% de NaClO (tratamiento 2).

Objetivo 3:

- El porcentaje de prendimiento de la microinjertación de limón Eureka sobre Citrange Troyer, fue influenciado por la concentración de sacarosa, resultando que a 45g/L de sacarosa en el medio de cultivo se obtuvo mayor prendimiento, e independiente del número de cotiledones del patrón.
- El porcentaje de prendimiento en la microinjertación de naranja Washington Navel sobre Citrange Troyer, fue influenciada por el número de cotiledones del patrón, resultando mayor prendimiento con cero o un cotiledón, y es independiente de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

Objetivo 4

- El número de hojas desarrolladas de los microinjertos de limón Eureka fue influenciado positivamente con 45g/L de sacarosa en el medio e independiente del factor número de cotiledones del patrón.
- El número de hojas desarrolladas de los microinjertos de naranja Washington Navel fue independiente del factor concentración de sacarosa en el medio de cultivo y del número de cotiledones del patrón.

Objetivo 5:

- La variable tamaño de hojas de los microinjertos de limón Eureka y de naranja Washington Navel sobre Citrange Troyer, no fueron influenciados ni por el número de cotiledones del patrón, ni por la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

Objetivo 6:

- Los microinjertos limón Eureka sobre Citrange Troyer presentaron mayor marchitez de hojas en los tratamientos de 75g/L de sacarosa en el medio, y el factor número de cotiledones del patrón no tuvo influencia sobre aquella variable.
- La marchitez de hojas en los microinjertos de naranja Washington Navel sobre Citrange Troyer, no se vio influenciada por los factores número de cotiledones y el concentración de sacarosa.

VI. RECOMENDACIONES

- Seleccionar a las plántulas portainjertos germinadas de edad de 18-30 días, y que presente vigorosidad o desarrollar diferentes tratamientos que estimule la germinación de semillas del portainjerto, para reducir el estrés durante el desarrollo de los microinjertos y posiblemente obtener mejor prendimiento.
- Seleccionar las plantas donadoras de varetas aplicándoles frecuentemente fungicida y bactericida sistémico a fin de obtener menor contaminación a *nivel in vitro*.
- Seleccionar y brindarles un cuidado adecuado a las plantas madres de las varetas, de las especies a microinjertar; además de hacerles un seguimiento, de ese modo se obtendrá mejor homogenización de los resultados y mayor información acerca de la influencia externa edafoclimática sobre las varetas y éstas a su vez sobre la microinjertación.
- Realizar más microinjertaciones en otras especies cítricas, empleando otros portainjertos trifoliados, como Citrumelo Swingle.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agusti, M. 2003. Citricultura. 2da Edición. Ediciones MUNDI-PRENSA. Libros España. p. 374 – 416.
2. Agusti, M. 2010. Fruticultura. 2da. Edición. Mundi-Prensa Libros. España. 507 p.
3. Barbee, D.; Goplen, s.; Thomas, O. and Nucholls, C. 1973. A review categorizing engineering design techniques of plants environmental simulators. J. Agric. Eng. Res. 18:13-29.
4. Beñatena, H. y Anderson, C. 1996. Los cítricos. En: A. Fabiani. R. Mika. L. Larocca. C. Anderson. Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay (en línea). INTA. Argentina.6 p. Consultado 24 mar. 2017. Disponible en http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_manual_citricultura_cap1.pdf
5. Berjak, P., Pammer, N. 2012. Semillas ortodoxas y recalcitrantes. Unidad de Investigación de Biología Celular de Plantas Facultad de Ciencias de la Vida. Universidad de Natal, Durban. 4041 Sudáfrica. Manual de semillas de árboles tropicales. p.143 - 155.
6. Bertalmío, A.; Maeso, D.; Sanguinetti, G.; Fontán, G.; De los Santos, M.; Borde, J.; Montes, F.; Colina, R. y Rivas, F. 2012. Saneamiento y certificación de cítricos. Revista de INIA Forticultura p. 49-53.
7. Besoain, X. 2008. Incidencia, caracterización y epidemiología del virus de la tristeza de los cítricos en Chile (en línea). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. 157 p. Consultado 24 mar. 2017. Disponible en <http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/161863620/La+exocortis+de+los+c%C3%ADtricos++su+control+en+las+nuevas+plantaciones/bab96ca8-d50a-4d15-bf6d-87f65e334e4e;jsessionid=4DCAFD3D5B59D89710B1D44195867813.node1>
8. Calcedo, A. y Gomez, J. 2006. Enfermedades provocadas por virus y viroides en huertos cítricos. Corpoica. 34:14-17.

9. Castle, W.; Tucker, D.; Krezdorn, A. and Yousey, C. 1993. Rootstocks for Florida Citrus. University of Florida, 231 p.
10. Camacho, O. 2008. Saneamiento de cítricos – microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, MINAG. La Habana. 6 p.
11. CAPA (Conselleria De Agricultura, Pesca y Alimentación). 2001. Patrones y variedades de cítricos. Patrones y variedades de cítricos. GENERALITAT VALENCIANA. Valencia. ES. 30 p.
12. Cravajal, J. 1960. Estudio de las deficiencia de nitrógeno, potasio, magnesio, boro y manganeso, en plantas de café (*Coffea arábica* var. *Typica*). Rev Biol.Trop. 8(2): 165-179.
13. CEDEFRUT A.C (Centro De Desarrollo Tecnológico Y Empresariales Para Frutales Del Trópico Húmedo De México A.C).2008. Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para saneamiento de cítricos (en línea). Mexico. Consultado 20 abr. 2016. Disponible en: <http://www.concitver.com/manualdesaneamientoydiagnostico/p6-MICROINJERTO%20DE%20C3%81PICES%20CAULINARES%20IN%20VITRO%20PARA%20SANEAMIENTO%20DE.pdf>
14. Chaturvedi, HC. Mitra, GC. 1974. Clonal Propagation *in vitro* from somatic callus cultures. Hort Science v. 1, t. 9. 118-120 p.
15. CIPF (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria, Italia). 2016. PD 15: Virus de la tristeza de los cítricos. NIMF 27. PD 15-23 p.
16. Da Graça, J.V. y van Vuuren, S.P. 2010. Managing Citrus tristeza virus losses using cross protection. En A.V. Karasev y M.E. Hilf, eds. Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases, págs. 247– 260. Eagan, MN, APS Press. 304 págs.
17. Diario GESTIÓN. 2016. Perú es el sétimo proveedor mundial de mandarinas y el principal destino es EE.UU. (en línea). Perú. Consultado 8 mar. 2016. Disponible en: <http://gestion.pe/economia/peru-setimo-proveedor-mundial-mandarinas-y-principal-destino-eeuu-2156132>
18. Domínguez, A. 2014. La citricultura ecológica. Junta de Andalucía. 1-120 p.

19. Durán-Vila, N. 2002 La exocortis de los cítricos: Su control en las nuevas plantaciones. Ficha técnica (en línea). Instituto Valenciano de Investigaciones Agraria. ES. Consultado 5 abr. 2016. Disponible en: <http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/161863620/La+exocortis+de+los+c%C3%ADtricos+-+su+control+en+las+nuevas+plantaciones/bab96ca8-d50a-4d15-bf6d-87f65e334e4e;jsessionid=4DCAFD3D5B59D89710B1D44195867813.node1>
20. Edriss, M. and Burguer, D. 1984. Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three Trifoliolate rootstocks. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands. *Scientia Horticulturae*. 23: 255 - 259
21. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2015. Mercados principales de cítricos y jugos de cítricos orgánicos. (En línea), Roma, Italia. 53p. Consultado 7 may. 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>
22. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Santiago). 2011. Frutas cítricas frescas y elaboradas (microficha). 46 p.
23. FAUTAPO (Fundación para el Apoyo a las Universidades de Tarija y Potosí, BO). 2015. Educación para el desarrollo, institución asociada. Producción de cítricos. (En línea), Bolivia Consultado 19 Feb. 2017. Disponible en: <http://www.formaciontecnicabolivia.org/webdocs/publicaciones/2015/citricosweb.pdf>
24. Ferrucci, F. 1997. Estudio global para identificar oportunidades de mercado de frutas y hortalizas de la región andina. IICA PROCIANDINO. 1: 110.
25. Figueroa, M., Olivera, G., Torres, J., Van, J., 2003. Avances sobre el efecto del frío en la germinación de semillas de portainjertos cítricos. Universidad Nacional de Tucumán. 5 p.
26. Fribourg, C. 2007. Virus, viroides y mollicutes de las plantas cultivadas en el Perú. UNALM. 115-207 p.
27. Gamboa, R. 2015. Comportamiento en vivero de cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre diferentes patrones en Satipo. Tesis para optar título. Universidad Agraria la Molina. PE. 68 p

28. García, A.; Río, J. Del; Porras, I.; Fuster, M.; Otuño, A. 2003. El limón y sus componentes bioactivos. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Departamento de Especies Leñosas. Estación Sericícola. Universidad de Murcia. 129 p.
29. Gauchan, D. 2012. Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea mays* L.). Kathmandu University Journal Of Science, Engineering and Technology. 8(1): 119-124.
30. González, C. 2014. Identificación de materiales de naranja para la agroindustria de jugos y concentrados de exportación, adaptados a las condiciones agroecológicas de la zona cafetera central. Tesis de grado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia Colombia. 1-123p.
31. González, R. 2007. Diseminación de bacterias, virus y viroides mediante semillas, portainjertos, varetas y plantas (en línea). México. 9 p.
32. Harper, S.J., Dawson, T.E. y Pearson, M.N. 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand Citrus tristeza virus isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Australasian Plant Pathology, 37: 379–386.
33. ICA (Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá). 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos. CO. 25 p.
34. Iglesias, L.; Rojas, P.; Enríquez, J. 2001. Utilización de las técnicas biotecnológicas en los programas de prevención del virus de la tristeza de los cítricos en el estado de Veracruz. Cuadernos de Biodiversidad. 6: 6-11.
35. INICTEL-UNI (Instituto Nacional de Investigación y Capacitación de Telecomunicaciones-Universidad Nacional de Ingeniería, PE). 2010. Producción de cítricos. Loreto, Perú. 22 p.
36. Iracheta, M.; Arrieta, L.; Rocha, M. 2012. Detección del Virus Tristeza de los Cítricos Mediante Anticuerpos Contra la Proteína Recombinante p25 de la Cápside Bajo un Sistema de Inmunoimpresión. Revista Mexicana de Fitopatología. 30(1):31-42.

37. Jonard, R., Hugard, J., Macheix, J., Martinez, J., Chancel, L., Poessel, J. and Villemur, P. 1983. *in vitro* micrografting and its applications to fruit science. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands. *Scientia Horticulturae*. 20: 147-159.
38. Lavado, G. 2008. Clasificación de los cítricos. *Industrias Alimentarias*. 12: 3-39
39. Lluna, L. 2006. Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta (en línea) *Horticultura*. Perú. Consultado 1 abr. 2016. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20general.pdf>
40. Marcela, A. 2013. Perfil de mercados de cítricos (en línea). Argentina, Base de datos MINAGRI. 14 p. Consultado 13 Jul. 2017. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_c%C3%ADtricos_2013.pdf
41. Mandel, T.; Candela, H.; Lamdau, Asis, L.; Zelinger, E.; Carles, C. y Eshed, L. 2016. Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the ERECTA, CLAVATA and class III HD-ZIP pathways. Published by The Company of Biologists Ltd. 143:1612-1622.
42. Marticorena, M. 2011. CRÓNICA: Huando, la naranja que murió de tristeza (en línea). Perú. Consultado 1 abr. 2016. Disponible en <http://elcomercio.pe/gastronomia/peruana/cronica-huando-naranja-que-murio-tristeza-noticia-717941>
43. Martínez-Hernández, MJ. López, AA. Osorio-Acosta, F. Gallardo, F. López, H. Mata, M. 2006. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia*. 31(8): 616-619.
44. Martínez, J. 2015. Control hormonal de la brotación en los cítricos: dominancia del fruto. Trabajo fin de grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural. Universidad Politécnica De Valencia. Valencia, España.
45. MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Republica Oriental del Uruguay. 2011. Protocolo a aplicar para el saneamiento de materiales de propagación de cítricos. 16 p.

46. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Magrama). 2008. Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero (en línea) España. Consultado 30 may. 2016. Disponible en <http://www.magrama.gob.es/app/MaterialVegetal/docs/patrones%20en%20el%20limonero.pdf>
47. MINAGRI (Ministerio de Agricultura, PE). 2008. Cítricos. Lima, Perú.
48. Monteverde, E.; García, M.; Briceño, M. 1999. Obtención de plantas cítricas libres de Psorosis y Exocortis en árboles infectados a través de la microinjertación de ápices *in vitro*. Agron. Tropical. 36: 5-14.
49. Monteverde, E., Espinoza, M., Ruiz, L. 1985. Identificada la xyloporosis de los cítricos en Venezuela con plantas indicadoras. FONAIAP. Agronomía Tropical. 35(1-3): 173-176.
50. Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. y Peña, L. 2008. Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology, 9(2):251- 68.
51. Morín, C. 1985. Cultivo de Cítricos. 2da. Edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica, 611 pp.
52. Morin, C.; Bacula, J.; Franciosi, R.; Salas, R.; San Martin, A.; Puigros, A. 1980. Cultivo de cítricos (en línea). 2da. Edición. Editorial IICA (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas), Perú.
53. Murashige, T. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
54. NAPPO (North American Plant Protection Organization, US). 2015. Leprosis de los cítricos. México. 12 p.
55. Navarro, L. 1979. Micro injerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Bol. Serv. Plagas. 5: 127-148.
56. Navarro, J. 2005. La revolución citrícola. Microinjertación de ápices caulinares de cítricos *in vitro*. PHYTOMA. 170: 8.
57. Navarro, 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* Woody species. Vegetative propagation Woody species. Acta horticulturae. 227: 43-55.

58. Naz, A., Jaskani, M., Abbas, H. and Qasim, M. 2007. *in vitro* studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. Pak. J. Bot. 39(5):1773-1778.
59. Manual técnico de buenas prácticas de cultivo en limón Pérsico. VIFINEX – El Salvador. 1-47 p.
60. Orozco, S. 1996. Enfermedades de los cítricos en México. Memorias sobre sistemas de producción de cítricos. Universidad Autónoma de Chapingo. 150 p.
61. Paniagua, R. 2004. Adaptación de la técnica de Microinjertación *in vitro* de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y Citrumelo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.). Instituto Tecnológico de Costa Rica Escuela de Biología. 32 p.
62. Peña, I., Pérez, J., López, D. y Batista, L. 2009. Principales enfermedades virales y afines de los cítricos. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana-Cuba.
63. Pequeño, I., Martínez, G., Aguirre, V., Iracheta, L., Mojica, V., Rodríguez, G. y Ojeda M. 2015. Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* L. BIOAGRO. 27(3): 167-172.
63. Picazo, I. 2014. Viroide exocortis de los cítricos (CEV). Inespecificidad de las alteraciones proteicas asociadas a la interacción viroide - huésped. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia. 173 p.
64. Pina L. 2009. Propagación de plantas. Aplicaciones de la Biotecnología a la propagación de plantas. Universidad Politécnica de Valencia. Editorial UPV. 13(193):298-313.
65. Ponpeu, J. 1980. Portaexertos para Citrus. In Citricultura Brasileira. Coordinado por O. Rodríguez; F. Viegas. Campiñas, Bra, Fundación Cargill. V.I. pp. 281-286.

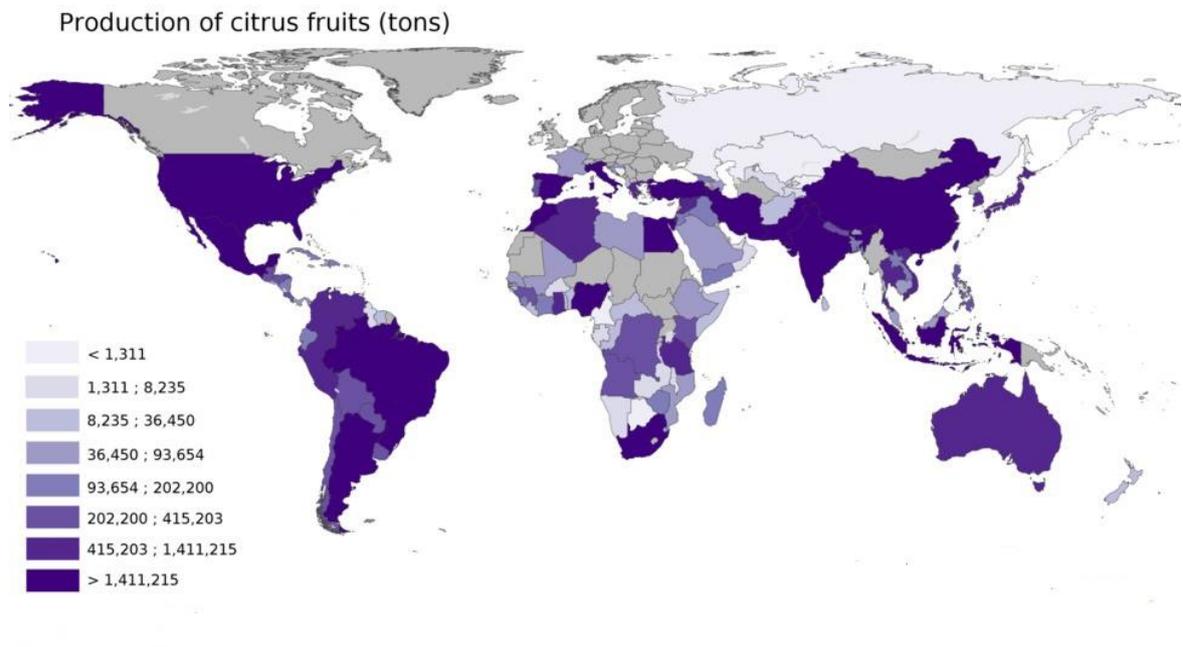
66. Pozo, F. 2005. Efecto de los portainjertos Citrange Troyer y Citrumelo Swingle sobre la producción y calidad de fruta de clemenules. Tesis para optar título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 1-32 p. (en línea). Santiago, CH. Consultado 25 Mar. 2017. Disponible en http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/101777/pozo_f.pdf?sequence=4
67. Rangan, T., Murashige, T. and Bitters, W. 1968. *in vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. HortScience 3:226-227.
68. Rey, H.Y; L.A. Mroginski y A.M. Scocchi. 1995. Embriogénesis somática en especies cítricas por cultivo de nucelas. Hort. Arg. 14 (36):54-64.
69. Reynaga, J. 2006. Germinación en semilla de Chile como respuesta a la aplicación de productos orgánico –hormonales. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. División de Agronomía, México. Tesis para obtener título. 78p.
70. Rincón, A., Vásquez A. y Padilla F. 2016. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 66 (1): 1-11
71. Rojas, P. 2001. Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC). Tesis Mg. Sc. Cordoba, ME, Universidad Veracruzana. 84 p.
72. Sánchez, H., Robles, P., Delgadillo, I. 2009. Programa para la detección y manejo de la leprosis (*Rhabdoviridae*) en México. SENASICA-SAGARPA. México. 2 p.
73. Soler, J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Editorial GENERALITAT VALENCIANA. Vol. Valencia. 20-23 p.
74. Sturges, H. (1926) The choice of a class-interval. J. Amer. Statist. Assoc., 21, 65–66.
75. Varela, F. 2015. Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México. Tesis para optar grado de Magister. Universidad autónoma de Nueva León. Mx. 98 p.

76. Vargas, D. 2013. Revista Productor Agropecuario (Proagro). (en línea). Lima, PE, DESIGNS. Consultado 10 abr. 2016. Disponible en <http://revistaproagro.com/peru-esta-entre-los-mejores-productores-de-citricos-a-nivel-del-hemisferio-sur/>
77. Vegas, U. Narrea, M. 2011. Manejo integrado del cultivo del limón. Piura, PE. UNALM-AGROBANCO. 43 p.
78. Velasco, M. 2013. Anatomía y manejo agronómico de plantas injertadas en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis para optar grado de magister. Universidad Autónoma de Shapingo. Mx. 153p.
79. Vidal, M. 2014. Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. 20 p.
80. Villachica, H. 1992. Portainjertos para cítricos en la selva peruana. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Agroindustrial. Lima, PE. 25 p.
81. Villegas, A., Andrade, M. 2005. Secado y almacenamiento de semillas de mandarino 'Cleopatra'. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.40, n.1, p.79-85.
82. Zamora, V; González, M; Peña, I; María, J; Castro, P. 2007. CitriFrut. 24(2): 26-35.
83. Zaragoza, S., Pina, J., Ángeles, M., Navarro, L., Medina, A., Soler, G., Chomé, P. 2011. Las variedades de cítricos. El material vegetal y el registro de variedades comerciales de España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 49 P.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

MAPA DE DISTRIBUCIÓN Y PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS (TONELADAS)



FUENTE: FAO (2105)

ANEXO 2

COMPOSICIÓN DE MEDIO MURASHIGE Y SKOOG (1962) CAISSON LABS

Componente	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Micronutrientes	
KI	0.75
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·7H ₂ O	22.3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Fuente de hierro	
Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	27.85
Na-EDTA·2H ₂ O	37.3
Vitaminas	
Glicina	2.0
Tiamina-HCl	0.1
Piridoxina-HCl	0.5
Ácido nicotínico	0.5
Myo-inositol	100

FUENTE: Murashige y Skoog (1962)

ANEXO 3

COMPOSICIÓN DE MEDIO MURASHIGE Y SKOOG (1962) CON VITAMINAS WHITE

Componente	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Micronutrientes	
KI	0.75
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·7H ₂ O	22.3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Fuente de hierro	
Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	27.85
Na-EDTA·2H ₂ O	37.3
Vitaminas de White	
Glicina	4.0
Tiamina-HCl	0.2
Piridoxina-HCl	1.0
Ácido nicotínico	1.0
Myo-inositol	200

FUENTE: Mrashige y Skoog (1962), y White (1963).

ANEXO 4

RESULTADOS OBTENIDOS DE PRUEBA PRELIMINAR DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE SEMILLAS CITRANGE TROYER

Tratamientos	[NaClO] (%)	Tiempo (minutos)	Unidad Experimental	Contaminación (%)	Germinación (%)	Quemados (%)
Testigo	0.16	5	30	0	90	0
Testigo	0.16	5	30	0	90	0
Testigo	0.16	5	30	5	80	0
T1	0.08	10	30	30	50	0
T1	0.08	10	30	20	80	0
T1	0.08	10	30	40	60	0
T3	0.16	10	30	0	10	75
T3	0.16	10	30	0	10	40
T3	0.16	10	30	5	10	50
T4	0.2	10	30	0	0	100
T4	0.2	10	30	0	0	90
T4	0.2	10	30	0	0	90
T5	0.8	10	30	0	0	100
T5	0.8	10	30	0	0	100
T5	0.8	10	30	0	0	100

Semillas de Citrange Troyer germinadas



ANEXO 5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PRUEBA PRELIMINAR DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE SEMILLAS CITRANGE TROYER

**Análisis de varianza del porcentaje de contaminación (%) - prueba no paramétrica
Kruskal Wallis**

Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
T1	3	30	10	30	7.35	0.0335
T3	3	1.67	2.89	0		
T4	3	0	0	0		
T5	3	0	0	0		
Testigo	3	1.67	2.89	0		

**Prueba comparativa de contaminación de las semillas del portainjerto - Kruskal
Wallis**

Tratamientos	Medias	Grupos	
T4	0	A	
T3	0	A	
T2	1.67	A	B
Testigo	1.67	A	B
T1	30		B

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

**Análisis de varianza del porcentaje de germinación -Prueba no paramétrica
Kruskal Wallis**

Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p-valor
Testigo	3	86.67	5.77	90	12.68	0.0084
T1	3	63.33	15.28	60		
T2	3	10	0	10		
T3	3	0	0	0		
T4	3	0	0	0		

Prueba comparativa de germinación de las semillas del portainjerto - Kruskal Wallis

Trat.	Medias	Grupos	
T5	0	A	
T4	0	A	
T3	10	A	B
T1	63.33		B
Testigo	86.67		B

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

Análisis de varianza del porcentaje de quemados - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p-valor
Testigo	3	0	0	0	12.45	0.0088
T1	3	0	0	0		
T2	3	55	18.03	50		
T3	3	93.33	5.77	90		
T4	3	100	0	100		

Prueba comparativa de quemados de las semillas del portainjerto - Kruskal Wallis

Tratamientos	Medias	Grupos	
Testigo	0	A	
T1	0	A	
T2	55	A	B
T3	93.33		B
T4	100		B

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

ANEXO 6

RESULTADOS OBTENIDOS DE PRUEBA PRILIMINAR DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE VARETAS DE LIMÓN EUREKA

Tratamientos	NaClO (%)	Tiempo (minutos)	Unidades experimentales	Contaminados (%)	Quemados (%)	N° Brotes
Testigo	0.88	10	20	100	0	1
Testigo	0.88	10	20	100	0	2
Testigo	0.88	10	20	90	0	2
T1	0.7	10	20	100	0	0
T1	0.7	10	20	100	0	0
T1	0.7	10	20	100	0	2
T2	0.88	20	20	100	0	2
T2	0.88	20	20	90	0	2
T2	0.88	20	20	90	0	2
T3	1	20	20	90	0	3
T3	1	20	20	85	0	4
T3	1	20	20	80	0	4
T4	1.5	20	20	95	95	1
T4	1.5	20	20	90	90	2
T4	1.5	20	20	100	100	0

Varetas de limón Eureka sembradas que luego desarrollaron algunos brotes



ANEXO 7

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE VARETAS DE LIMÓN EUREKA

Análisis de varianza del porcentaje de contaminación de varetas de limón Eureka - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
T1	3	100	0	100	7.17	0.0814
Testigo	3	96.67	5.77	100		
T2	3	93.33	5.77	90		
T3	3	85	5	85		
T4	3	95	5	95		

Análisis de varianza del porcentaje de quemados de varetas de limón Eureka - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	Tiempo (min)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
T1	10	3	0	0	0	6.75	0.008
Testigo	10	3	0	0	0		
T2	20	3	0	0	0		
T3	20	3	0	0	0		
T4	20	3	95	5	95		

Prueba comparativa de quemados de varetas limón Eureka - Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	Medias	Grupos
T3	0	A
T2	0	A
T1	0	A
Testigo	0	A
T4	95	B

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

Análisis de varianza de número de brotes producidos por cada vareta de limón Eureka - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	Tiempo (min)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
T1	10	3	0.67	1.15	0	8.81	0.0421
Testigo	10	3	1.67	0.58	2		
T2	20	3	2	0	2		
T3	20	3	3.67	0.58	4		
T4	20	3	1	1	1		

Prueba comparativa de número de brotes producidos por cada vareta de varetas limón Eureka - Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	Medias	Grupos	
T1	0.67	A	
T4	1	A	
Testigo	1.67	A	B
T2	2	A	B
T3	3.67		B

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

ANEXO 8

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE VARETAS DE NARANJA WASHINGTON NAVEL

Tratamientos	(NaClO(%))	Tiempo (min)	Unidades experimentales	Contaminados (%)	Quemados (%)	N° Brotes
Testigo	0.88	10	20	100	0	3
Testigo	0.88	10	20	90	0	2
Testigo	0.88	10	20	100	0	0
T1	0.7	10	20	100	0	0
T1	0.7	10	20	100	0	0
T1	0.7	10	20	100	0	0
T2	0.88	20	20	100	0	1
T2	0.88	20	20	90	0	1
T2	0.88	20	20	85	0	2
T3	1	20	20	83	0	4
T3	1	20	20	65	0	3
T3	1	20	20	75	0	3
T4	1.5	20	20	80	100	0
T4	1.5	20	20	100	100	0
T4	1.5	20	20	90	100	0

Varetas de naranja Washington Navel sembradas que luego desarrollaron brotes



ANEXO 9

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE VARETAS DE NARANJA WASHINGTON NAVEL

Análisis de varianza de porcentaje de porcentaje de contaminación de naranja Washington Navel - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamiento (T)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
T1	3	100	0	100	8.1	0.0593
Testigo	3	96.67	5.77	100		
T2	3	91.67	7.64	90		
T3	3	74.33	9.02	75		
T4	3	90	10	90		

Análisis de varianza del porcentaje de quemados de varetas de naranja Washington Navel - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamiento (T)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
T1	3	0	0	0	6.75	0.0073
Testigo	3	0	0	0		
T2	3	0	0	0		
T3	3	0	0	0		
T4	3	100	0	100		

Prueba comparativa de porcentaje de quemados de varetas limón Eureka - Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	Medias	Grupos
T3	0	A
T2	0	A
T1	0	A
Testigo	0	A
t4	100	B

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

Análisis de varianza de número de brotes producidos por cada vareta de naranja Washington Navel - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

Tratamiento (T)	N	Medias	D.E.	Mediana s	H	p
T1	3	0	0	0	10.03	0.0237
Testigo	3	1.67	1.53	2		
T2	3	1.33	0.58	1		
T3	3	3.33	0.58	3		
T4	3	0	0	0		

Prueba comparativa de número de brotes producidos por cada vareta de varetas limón Eureka - Kruskal Wallis

Tratamientos (T)	Medias	Grupos	
T1	0	A	
T4	0	A	
T2	1.33	A	B
Testigo	1.67	A	B
T3	3.33		B

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

ANEXO 10

RESULTADOS OBTENIDOS DEL PRENDIMIENTO DE MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON NAVEL

Microinjertos prendidos de limón Eureka

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	N° de cotiledones	Unidad Experimental	Prendimiento (%)
T1	45	2	10	20
T1	45	2	10	0
T1	45	2	10	10
T2	45	1	10	20
T2	45	1	10	20
T2	45	1	10	10
T3	45	0	10	20
T3	45	0	10	10
T3	45	0	10	10
T4	75	2	10	0
T4	75	2	10	0
T4	75	2	10	0
T5	75	1	10	10
T5	75	1	10	0
T5	75	1	10	10
T6	75	0	10	0
T6	75	0	10	0
T6	75	0	10	20

Microinjertos prendidos de naranja Washington Navel

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	N° de cotiledones	Unidad Experimental	Prendimiento (%)
T1	45	2	10	10
T1	45	2	10	10
T1	45	2	10	10
T2	45	1	10	20
T2	45	1	10	10
T2	45	1	10	30
T3	45	0	10	30
T3	45	0	10	30
T3	45	0	10	30
T4	75	2	10	10
T4	75	2	10	10
T4	75	2	10	20
T5	75	1	10	20
T5	75	1	10	10
T5	75	1	10	10
T6	75	0	10	10
T6	75	0	10	30
T6	75	0	10	30

ANEXO 11
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PRENDIMIENTO DE MICROINJERTOS DE
LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON NAVEL

Análisis de varianza del porcentaje de prendimiento de microinjertos limón Eureka

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	655.56	7	93.65	1.79	0.1939
Concentración de sacarosa	355.56	1	355.56	6.81	0.0261
N° cotiledones	144.44	2	72.22	1.38	0.2949
Repeticiones	144.44	2	72.22	1.38	0.2949
Concentración de sacarosa*N° de cotiledones	11.11	2	5.56	0.11	0.9001
Error	522.22	10	52.22		
Total	1177.78	17			

Se obtuvo un R² de 0,56 y un coeficiente de variabilidad de 81.30

Prueba comparativa Tukey del factor concentración de sacarosa - porcentaje de

Sacarosa (g/L)	Medias (%)	n	Grupos
45	13.33	9	A
75	4.44	9	B

prendimiento de microinjertos limón Eureka

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

Prueba comparativa Tukey del factor número de cotiledones - porcentaje de
prendimiento de microinjertos limón Eureka

N° cotiledones	Medias (%)	N	Grupo
1	11.67	6	A
0	10	6	A
2	5	6	A

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

Prueba comparativa Tukey de las repeticiones- porcentaje de prendimiento de microinjertos limón Eureka

Repeticiones	Medias (%)	n	E.E.	Grupo
1	11.67	6	2.95	A
3	10	6	2.95	A
2	5	6	2.95	A

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

Prueba comparativa Tukey de la interacción de la concentración de sacarosa con número de cotiledones de microinjertos de naranja limón Eureka

Sacarosa (g/L)	N° cotiledones	Medias (%)	n	Grupo
45	1	16.67	3	A
45	0	13.33	3	A
45	2	10	3	A
75	1	6.67	3	A
75	0	6.67	3	A
75	2	0	3	A

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

Análisis de varianza del porcentaje de prendimiento de microinjertos naranja Washington Navel

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1116.67	9	124.07	2.98	0.0696
Concentración de sacarosa	50	1	50	1.2	0.3052
Número de cotiledones	700	2	350	8.4	0.0108
Repeticiones	100	2	50	1.2	0.3501
Concentración de sacarosa*Número de cotiledones	266.67	4	66.67	1.6	0.2646
Error	333.33	8	41.67		
Total	1450	17			

Se obtuvo un R^2 de 0,77 y un coeficiente de variabilidad de 35.21

Prueba comparativa Tukey del factor concentración de sacarosa - porcentaje de prendimiento de microinjertos de naranja Washington Navel

Sacarosa (g/L)	Medias (%)	n	E.E.	Grupo
45	20	9	2.15	A
75	16.67	9	2.15	A

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

Prueba comparativa Tukey del factor número de cotiledones - porcentaje de prendimiento de microinjertos naranja Washington Navel

Número de cotiledones	Medias (%)	n	E.E.	Grupos	
0	26.67	6	2.64	A	
1	16.67	6	2.64	A	B
2	11.67	6	2.64		B

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

Prueba comparativa Tukey de las repeticiones- porcentaje de prendimiento de microinjertos de naranja Washington Navel

Repeticiones	Medias (%)	n	E.E.	Grupo
3	21.67	6	2.64	A
2	16.67	6	2.64	A
1	16.67	6	2.64	A

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

Prueba comparativa Tukey de la interacción de la concentración de sacarosa con número de cotiledones de microinjertos de naranja naranja naranja Washington Navel

Sacarosa (g/L)	N° de cotiledones	Repeticiones	Medias (%)	n	Grupo
75	0	3	31.67	1	A
45	0	1	31.67	1	A
45	1	3	28.33	1	A
45	0	3	28.33	1	A
75	0	2	25	1	A
45	0	2	25	1	A
75	1	1	18.33	1	A
75	0	1	18.33	1	A
75	2	3	16.67	1	A
45	1	2	15	1	A
75	1	2	15	1	A
45	2	2	15	1	A
45	2	3	13.33	1	A
45	1	1	11.67	1	A
75	1	3	11.67	1	A
45	2	1	11.67	1	A
75	2	1	8.33	1	A
75	2	2	5	1	A

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

ANEXO 12
RESULTADOS OBTENIDOS DE NÚMERO DE HOJAS DESARROLLADAS
DE MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON
NAVEL

Número de hojas desarrolladas de microinjertos de limón Eureka

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	Nº cotiledones	Unidad Experimental	Nº hojas promedio
T1	45	2	2	5
T1	45	2	1	7
T2	45	1	3	7
T2	45	1	2	5
T3	45	0	2	4
T3	45	0	2	8
T5	75	1	1	5
T5	75	1	1	1
T6	75	0	1	4
T6	75	0	1	2

Número de hojas desarrollo de microinjertos de naranja Washington Navel

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	Nº cotiledones	Unidad Experimental	Nº hojas promedio
T1	45	2	1	7
T1	45	2	1	2
T1	45	2	1	1
T2	45	1	2	2
T2	45	1	1	3
T2	45	1	3	4
T3	45	0	3	3
T3	45	0	3	4
T3	45	0	3	3
T4	75	2	1	2
T4	75	2	1	9
T4	75	2	2	3
T5	75	1	2	4
T5	75	1	1	1
T5	75	1	1	3
T6	75	0	1	1
T6	75	0	3	2
T6	75	0	3	2

ANEXO 13
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NÚMERO DE HOJAS DESARROLLADAS DE
MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON
NAVEL

Análisis de varianza del factor número de cotiledones sobre el desarrollo de número de hojas de microinjertos limón Eureka

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.6	2	1.8	0.32	0.7396
Número de cotiledones	3.6	2	1.8	0.32	0.7396
Error	40	7	5.71		
Total	43.6	9			

Se obtuvo un R^2 de 0.5 y un coeficiente de variabilidad de 34.55

Análisis de varianza del factor concentración de sacarosa sobre el desarrollo de número de hojas de microinjertos limón Eureka

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21.6	1	21.6	7.85	0.0231
Concentración de sacarosa	21.6	1	21.6	7.85	0.0231
Error	22	8	2.75		
Total	43.6	9			

Se obtuvo un R^2 de 0.5 y un coeficiente de variabilidad de 34.55

Prueba comparativa Tukey del factor concentración de sacarosa sobre el desarrollo de número de hojas de microinjertos limón Eureka

Concentración de sacarosa	Medias	n	Grupos	
45	6	6	A	
75	3	4		B

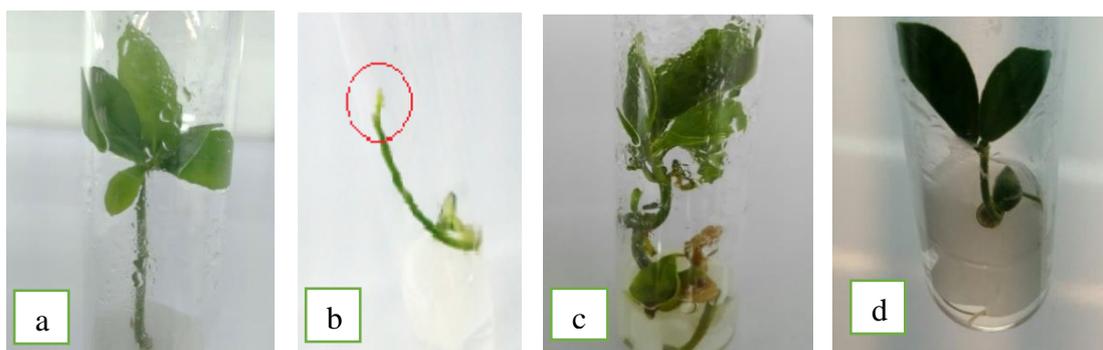
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Análisis de varianza del factor número de cotiledones sobre el desarrollo de número de hojas de microinjertos Washington Navel

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14.44	5	2.89	0.6	0.6981
Concentración de sacarosa	0.22	1	0.22	0.05	0.8329
Número de cotiledones	7.44	2	3.72	0.78	0.4807
Concentración de sacarosa*Número cotiledones	6.78	2	3.39	0.71	0.5115
Error	57.33	12	4.78		
Total	71.78	17			

Se obtuvo un R^2 de 0.2 y un coeficiente de variabilidad de 70.26

Fotos para la comparación de número de hojas desarrolladas de algunos microinjertos:



Comparación del número de hojas desarrolladas: Microinjertos de limón Eureka a) Tratamiento 1 (45g/L sacarosa con dos cotiledones); b) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa con un cotiledón); y Microinjertos de naranja Washington Navel c) Tratamiento 2 (45g/L sacarosa y un cotiledón); d) Tratamiento 4 (75g/L sacarosa y dos cotiledón).

ANEXO 14
RESULTADOS OBTENIDOS DE TAMAÑO DE HOJAS DESARROLLADAS
DE MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON
NAVEL

Tamaño de hojas desarrolladas de microinjertos de limón Eureka

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	N° cotiledones	Unidad Experimental	Pequeña [2, 12>	Mediana [12,23>	Grande [23,35]
				Tamaño de hoja [Frecuencia (%)]		
T1	45	2	10	60	20	20
T1	45	2	7	57.14286	28.57143	14.28571
T2	45	1	21	42.85714	42.85714	14.28571
T2	45	1	10	60	40	20
T3	45	0	8	25	25	50
T3	45	0	16	0	50	50
T5	75	1	5	80	0	20
T5	75	1	1	0	0	100
T6	75	0	4	100	25	25
T6	75	0	2	0	100	0

Tamaño de hojas desarrolladas de microinjertos de naranja Washington Navel

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	N° cotiledones	Unidad Experimental	Pequeña [2, 12>	Mediana [12,23>	Grande [23,35]
				Tamaño de hoja [Frecuencia (%)]		
T1	45	2	7	0	57.1428571	42.8571429
T1	45	2	2	0	50	50
T1	45	2	1	0	0	100
T2	45	1	4	50	50	0
T2	45	1	3	66.6666667	0	33.3333333
T2	45	1	12	75	25	0
T3	45	0	9	0	33.3333333	66.6666667
T3	45	0	12	0	50	50
T3	45	0	3	0	33.3333333	66.6666667
T4	75	2	2	0	50	50
T4	75	2	9	55.5555556	33.3333333	11.1111111
T4	75	2	6	0	33.3333333	66.6666667
T5	75	1	8	0	50	50
T5	75	1	1	0	0	100
T5	75	1	3	0	33.3333333	33.3333333
T6	75	0	1	0	0	100
T6	75	0	6	0	50	50
T6	75	0	6	0	0	100

ANEXO 15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TAMAÑO DE HOJAS DESARROLLADAS DE
MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON
NAVEL

Análisis de varianza Kruskal Wallis de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos de limón Eureka (%) – Número de cotiledones

N° cotiledones	Tamaño	N	Medias (%)	D.E.	Medianas	H	P
0	GRANDES	4	31.25	47.32	12.5	6.49	0.5818
0	MEDIANAS	4	50	35.36	37.5		
0	PEQUEÑAS	4	31.25	23.94	37.5		
1	GRANDES	4	45.71	34.05	51.43		
1	MEDIANAS	4	20.71	23.95	20		
1	PEQUEÑAS	4	38.57	41.04	20		
2	GRANDES	2	58.57	2.02	58.57		
2	MEDIANAS	2	24.29	6.06	24.29		
2	PEQUEÑAS	2	17.14	4.04	17.14		

Análisis de varianza Kruskal Wallis de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos de limón Eureka (%) - Concentración de sacarosa

Sacarosa (g/L)	Tamaño	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
45	GRANDES	6	40.83	24.18	50	1.83	0.8683
75	GRANDES	4	45	52.6	40		
45	MEDIANAS	6	34.4	11.63	34.29		
75	MEDIANAS	4	31.25	47.32	12.5		
45	PEQUEÑAS	6	28.1	17.16	20		
75	PEQUEÑAS	4	36.25	43.85	22.5		

Análisis de varianza Kruskal Wallis de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos de naranja Washington Navel (%) – Número de cotiledones

N° cotiledones	Tamaño	N	Medias (%)	D.E.	Medianas	H	P
0	GRANDES	5	0	0	0	20.88	0.0041
0	MEDIANAS	6	27.78	22.77	33.33		
0	PEQUEÑAS	6	72.22	22.77	66.67		
1	GRANDES	6	31.94	35.91	25		
1	MEDIANAS	6	26.39	22.62	29.17		
1	PEQUEÑAS	6	36.11	37.14	33.33		
2	GRANDES	7	7.94	21	0		
2	MEDIANAS	6	37.3	20.68	41.67		
2	PEQUEÑAS	6	53.44	29.22	50		

Prueba comparativa Kruskal Wallis de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos de naranja Washington Navel (%) - Concentración de sacarosa

Tratamientos	Medias (%)	Grupos			
0.00:GRANDES	0	A			
2.00:GRANDES	7.94	A	B		
1.00:MEDIANAS	26.39	A	B	C	
0.00:MEDIANAS	27.78	A	B	C	
1.00:PEQUEÑAS	36.11	A	B	C	
1.00:GRANDES	31.94	A	B	C	
2.00:MEDIANAS	37.3		B	C	D
2.00:PEQUEÑAS	53.44			C	D
0.00:PEQUEÑAS	72.22				D

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

Análisis de varianza Kruskal Wallis de tamaño de hojas de los microinjertos prendidos de naranja Washington Navel (%) - Concentración de sacarosa

Tamaño	Sacarosa (g/L)	N	Medias (%)	D.E.	Medianas	H	P
GRANDES	45	9	21.3	32.57	0	14.91	0.0066
GRANDES	75	9	6.17	18.52	0		
MEDIANAS	45	9	33.2	21.48	33.33		
MEDIANAS	75	9	27.78	22.05	33.33		
PEQUEÑAS	45	9	45.5	32.02	50		
PEQUEÑAS	75	9	62.35	32.01	50		

ANEXO 16
RESULTADOS OBTENIDOS DE PORCENTAJE DE HOJAS MARCHITAS DE
MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON
NAVEL

Hojas marchitas de los microinjertos prendidos de limón Eureka

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	N° de cotiledones	Unidad Experimental	Hojas marchitas (%)
T1	45	2	2	0
T1	45	2	1	0
T2	45	1	3	0
T2	45	1	2	20
T3	45	0	2	25
T3	45	0	2	0
T5	75	1	1	40
T5	75	1	1	0
T6	75	0	1	75
T6	75	0	1	50

Hojas marchitas de los microinjertos prendidos de naranja Washington Navel

Tratamientos	Sacarosa (g/L)	N° de cotiledones	Unidad Experimental	Hojas marchitas (%)
T1	45	2	1	57.1428571
T1	45	2	1	50
T1	45	2	1	0
T2	45	1	2	0
T2	45	1	1	0
T2	45	1	3	0
T3	45	0	3	0
T3	45	0	3	25
T3	45	0	3	66.67
T4	75	2	1	0
T4	75	2	1	0
T4	75	2	2	100
T5	75	1	2	100
T5	75	1	1	33.33
T5	75	1	1	0
T6	75	0	1	0
T6	75	0	3	100
T6	75	0	3	50

ANEXO 17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PORCENTAJE HOJAS MARCHITAS DE
MICROINJERTOS DE LIMÓN EUREKA Y NARANJA WASHINGTON
NAVEL

Análisis de varianza del factor número de cotiledones sobre el desarrollo de porcentaje de marchitez de hojas de microinjertos limón Eureka

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2115	2	1057.5	1.75	0.2416
N° cotiledones	2115	2	1057.5	1.75	0.2416
Error	4225	7	603.57		
Total	6340	9			

Se obtuvo un R^2 de 0.33 y un coeficiente de variabilidad de 116.99

Prueba comparativa Tukey del factor número de cotiledones sobre el desarrollo de porcentaje de marchitez de hojas de microinjertos limón Eureka

N° cotiledones	Medias (%)	n	Grupo
0	37.5	4	A
1	15	4	A
2	0	2	A

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

Análisis de varianza del factor concentración de sacarosa sobre el desarrollo de porcentaje de marchitez de hojas de microinjertos limón Eureka

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2733.75	1	2733.75	6.06	0.0392
Sacarosa (g/L)	2733.75	1	2733.75	6.06	0.0392
Error	3606.25	8	450.78		
Total	6340	9			

Se obtuvo un R^2 de 0.43 y un coeficiente de variabilidad de 101.1

Prueba comparativa Tukey del factor concentración de sacarosa sobre el desarrollo de porcentaje de marchitez de hojas de microinjertos limón Eureka

Sacarosa (g/L)	Medias (%)	n	Grupos
75	41.25	4	A
45	7.5	6	B

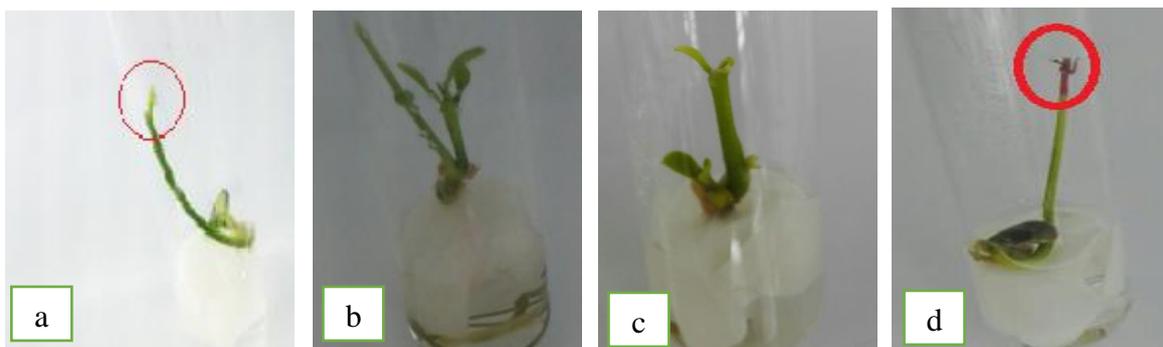
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Análisis de varianza del factor concentración de sacarosa sobre el desarrollo de porcentaje de marchitez de hojas de microinjertos naranja Washington Navel.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4559.38	5	911.88	0.52	0.7571
N° cotiledones	1021	2	510.5	0.29	0.7527
[sacarosa]	1891.48	1	1891.48	1.08	0.3197
N° cotiledones*[sacarosa]	1646.91	2	823.45	0.47	0.6365
Error	21059.46	12	1754.96		
Total	25618.84	17			

Se obtuvo un R^2 de 0.18 y un coeficiente de variabilidad de 129.53.

Fotos de algunos microinjertos con hojas marchitas:



Marchites de hojas: Microinjertos de limón Eureka a) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa con un cotiledón); b) Tratamiento 6 (75g/L sacarosa con un cotiledón). Microinjertos de naranja Washington Navel c) Tratamiento 6 (75g/L sacarosa con cero cotiledones); d) Tratamiento 5 (75g/L sacarosa con un cotiledón).