

Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Botánica

Establecimiento de un sistema de organogénesis *in vitro* en
Citrus reticulata Blanco a partir de segmentos de hojas y
entrenudos

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela,

por la bachiller Vanessa Medina

Rivas como requisito parcial

para optar el título de Licenciado

en Biología.

Tutora: Dra. Teresa Edith Vargas.

CARACAS, VENEZUELA

Julio, 2012

Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Botánica



Establecimiento de un sistema de organogénesis *in vitro* en
Citrus reticulata Blanco a partir de segmentos de hojas y
entrenudos

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela,

por la bachiller Vanessa Medina

Rivas como requisito parcial

para optar el título de Licenciado

en Biología.

Tutora: Dra. Teresa Edith Vargas.

CARACAS, VENEZUELA

Julio, 2012

I. ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4 D	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacetico
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANA	Ácido naftaleno- acético
AIA	Ácido indol-acetico
BA	Bencil-adenina
° C	Grados centígrados
cm	Centímetros
DBA3	Medio basal MT suplementado con 20 ml/L de agua de coco
g/L	Gramos por litros
HCl	Ácido clorhídrico
IBA	Ácido indol-butírico
K	Cinetina
L	Litros
m	Metros
mg/L	Miligramos por litro
mm	Milímetros
MS	Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog, 1962.
MT	Medio de cultivo descrito por Murashige y Tucker.
NaOH	Hidróxido de sodio

INDICE

I. Índice de tablas	iv
II. Abreviatura utilizadas	v
1. INTRODUCCION	8
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Descripción botánica de <i>Citrus reticulata</i> Blanco.	11
2.1.1 Taxonomía y origen	11
2.1.2 Morfología general	11
2.1. 3 Poliembrionía en cítricos	12
2.2 Importancia económica	14
2.3.1 Cultivo tradicional de la mandarina en Venezuela.	17
2.4. Cultivo <i>in vitro</i>	18
2.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> mandarina	21
2.4.1.1 Micropropagación clonal mediante yemas y microesquejes	21
2.4.1.2 Organogénesis <i>in vitro</i>	22
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo General	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	33

4.1 Germinación de semillas de <i>Citrus reticulata</i>	33
4.1.1 Material Vegetal	33
4.1.2 Desinfección de las semillas	33
4.1.3 Medio de germinación	33
4.2 Multiplicación de microesquejes	34
4.2.1 Material Vegetal	34
4.2.2 Medios de cultivo	34
4.3 Organogénesis de segmentos de hojas y entrenudos	34
4.3.1 Material Vegetal	34
4.3.2 Medios de cultivo	34
4.4 Medios de enraizamiento	35
4.5 Siembra de los explantes	36
4.6 Condiciones del cultivo <i>in vitro</i>	36
4.6.1 Germinación semillas	36
4.6.2 Multiplicación a partir de microesquejes	36
4.6.3 Organogénesis de segmentos de entrenudos	36
4.6.4 Organogénesis de segmentos de hojas	36

4.7 Observaciones	38
4.8 Aclimatización	38
4.9 Caracterización anatómica	38
4.10 Análisis estadístico	39
5. RESULTADOS	40
5.2 Germinación de semillas de <i>Citrus reticulata</i>	40
5.2.1 Establecimiento del cultivo	40
5.2.2 Germinación de semillas con cubierta seminal de <i>C. reticulata</i>	40
5.2.3 Germinación de semillas sin cubierta seminal de <i>C. reticulata</i>	40
5.3 ORGANOGÉNESIS	42
5.3.1 Multiplicación a partir de microesquejes de <i>C. reticulata</i>	42
5.3.2 Organogénesis de <i>C. reticulata</i> a partir de segmentos de entrenudos	45
5.3.3 Organogénesis de segmentos de hojas de <i>C. reticulata</i>	48
5.4 Aclimatización	53
6. DISCUSION	56
6.1 Germinación de semillas de <i>Citrus reticulata</i>	56
6.2 Multiplicación u organogénesis de <i>C. reticulata</i> a partir de microesquejes	57
6.3 Organogénesis de <i>C. reticulata</i> a partir de segmentos de segmentos de entrenudos	58
6.4 Organogénesis de <i>C. reticulata</i> a partir de segmentos de segmentos de hojas	60
6.5 Enraizamiento	62

7. CONCLUSIONES	63
8. BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUCCION

La mandarina (*Citrus reticulata*) pertenece a la familia de las Rutáceas, y al género *Citrus* que posee especies de gran valor económico como: (*Citrus sinensis* L.) naranja, (*Citrus reticulata* B.) mandarina y (*Citrus limón* L.) limones, que se consideran número uno en el mundo debido a su alto valor nutricional y los productos procesados de estas frutas son considerables. Chaturvedi y col., 2001 (citado por Shawkat, 2006).

Las mandarinas son cultivadas por sus propiedades nutricionales y medicinales, entre las que se destacan las siguientes, su mayor componente es el agua y, respecto a otras frutas de su género aporta menos cantidad de azúcares y por tanto menos calorías, la cantidad de fibra es apreciable y se encuentra sobre todo en la parte blanca entre la pulpa y la corteza y su consumo favorece el tránsito intestinal. De su contenido vitamínico sobresale la vitamina C, el ácido fólico y la provitamina A, más abundante que en cualquier otro cítrico, también contiene cantidades destacables de ácido cítrico, potasio y magnesio. En menor proporción se encuentran ciertas vitaminas del grupo B y minerales como el calcio, aunque de menor aprovechamiento que el que procede de los lácteos u otros alimentos que son buena fuente de dicho mineral. La provitamina A o betacaroteno se transforma en vitamina A en nuestro organismo conforme este lo necesita. Dicha vitamina es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. La vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones. (Agustí, 2003).

En la producción comercial de árboles frutales es un objetivo muy importante la uniformidad de las plantaciones, por los beneficios agronómicos que esto implica. Por este motivo es ampliamente usado el método de reproducción asexual, con algunas variantes entre las especies. (Martínez, 1988).

El cultivo *in vitro* de cítricos ha sido una metodología de gran utilidad para complementar los programas de mejoramiento genético de estas especies. Diversas estrategias de regeneración han sido establecidas para estos propósitos. Estas se basan principalmente en el cultivo de brotes apicales, microesquejes, epicotílos y germinación de semillas. El desarrollo de técnicas biotecnológicas ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de cítricos. Entre ellas, la transformación genética tiene gran potencial y permite la introducción de genes que modifican características de interés agronómico, manteniendo las características originales de una variedad y evitando la transferencia de características negativa (Arancibia, 2008).

La micropropagación es un importante método asexual, que puede ser usado para la producción de plantas genéticamente idénticas, así como plantas libres de virus, Roistacher y col., 1976 (Shawkat, 2006). Los sistemas de propagación *in vitro* con un promedio alto de multiplicación, no solo son un importante método asexual que puede ser usado para la producción de plantas clonales, sino también forman la base para la introducción de variación genética por transformación genética o mutagénesis. En ambos casos, es necesario ser capaz de regenerar vástagos viables los cuales puedan ser propagados por organogénesis o embriogénesis somática (Pérez y col., 2010).

La organogénesis es un proceso de regeneración que implica la formación de órganos de *novo* a partir de pequeños grupos celulares meristemáticos, denominados meristemoide (Villalobos, 1990). Este proceso puede ocurrir directamente del explante, o indirectamente, con la formación previa de callo, definido como una estructura, desorganizada de crecimiento acelerado y continuo formada por células en división, que se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta (Gómez, 1998).

Cuando hablamos del sistema de cultivo tradicional de las mandarinas en Venezuela, nos encontramos con una situación bastante precaria, ya que no se garantiza que el material vegetal a ser propagado pertenezca a clones élites, altamente productivos y no se certifica la fitosanidad de las plantas, en cuanto a virus y sub-virus. Por lo que cultivo *in vitro* se convierte en una herramienta importante para la producción de plantas y patrones sanos, banco de germoplasma. La propagación de plantas élites, para contribuir en los programas de mejoramiento (Aular, 2006).

Debido a la importancia de esta especie y a las ventajas que ofrece el proceso de organogénesis como herramienta biotecnológica; este trabajo tiene como objetivo el establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis de *Citrus reticulata* B. a partir de segmentos de entrenudos y hojas.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Descripción botánica de *Citrus reticulata* Blanco.

2.1.1 Taxonomía y origen

Citrus reticulata pertenece a la División Spermatophyta, Subdivisión Angiosperma, Clase Dicotiledónea, Subclase Arquiclamideas, Orden Sapindales, Familia Rutáceae, Subfamilias Aurantioideae, Genero Citrus, Especie *Citrus reticulata* B. Nombres comunes: mandarina.

Originario del sureste de Asia, es muy conocido y cultivado en todas las regiones tropicales por el sabroso sabor de sus frutos (Fermín, 1990). Se clasifican como “mandarinas” todos los cítricos de cáscara suelta, es decir, que se desprende fácilmente de la pulpa; entre estos se distinguen la mandarina y la tangerina.



Figura N° 1.-Detalle del fruto de *Citrus reticulata*, mandarina.

2.1.2 Morfología general

Los seis géneros que constituyen los cítricos verdaderos (*Citrus*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Microcitrus* y *Poncirus*) se encuentran dentro de las subtribu *Citrinae* y solo tres de ellos tiene importancia comercial: *Poncirus* (naranja trifoliado), *Fortunella* (Kumquat) y *Citrus* (Moore, 2001). Las especies del género *Citrus* son las mas importantes desde el punto de vista agronómico (Agustí, 2003)

Las hojas de los cítricos en general son elípticas o lanceoladas. El tallo es derecho y de forma más o menos cilíndrica, con ramificaciones de altura variable, de acuerdo con la especie y la variedad. Las raíces de los cítricos se caracterizan por tener de dos a tres raíces principales que se desarrollan hasta una profundidad de tres metros. Las flores son comúnmente conocidas con el nombre de azahares, de color blanco o teñidas de rojo púrpura, generalmente hermafroditas.

El fruto es un hesperidio de forma oval, periforme, aplanada o esférica, la corteza es indehiscente, con glándulas oleíferas, secretoras de aceites esenciales; puede ser gruesa (pomelo) o delgada (mandarina), lisa o rugosa y de color verde, amarillo, anaranjado o rojizo. En la pulpa se encuentran carotenoides, azúcares y ácidos. La acidez de los jugos se debe fundamentalmente al ácido cítrico. También contienen pectinas, sustancias nitrogenadas, enzimas y vitaminas C. Las semillas externamente son de color blanco, crema, marfil o amarillento, en su interior pueden ser de color canela, púrpura, rosado o amarillo.

2.1. 3 Poliembrionía en cítricos

Es una característica hortícola muy importante en la producción comercial de árboles, especialmente de cítricos, en los cuales un gran número de las especies producen semillas poliembriónicas, en un grado muy variado (Frost y Shoot, 1968, citado por Martínez, 1988). La semilla puede presentar un embrión procedente de un óvulo fertilizado y uno o varios embriones formados a partir de tejido nucelar. Esta semilla puede producir más de una plántula. Se cree que la poliembrionía es un carácter recesivo controlado por

una serie múltiple de genes (Maheshwari y Ranga Swamy, 1958 citado por Martínez, 1988).

En variedades poliembriónicas, la inducción de los embriones nucelares parece depender del estímulo de la polinización pero quizás no invariablemente necesaria (Frost y Shoot, 1968 citado por Martínez, 1988). El número de embriones por semilla varía considerablemente incluso de un árbol a otro (Frost y Shoot, 1968 citado por Martínez, 1988) y es influenciado significativamente por el estado nutricional y fisiológico del árbol. Incluso semillas poliembriónicas y monoembriónicas pueden ocurrir en el mismo fruto y hasta en el mismo lóculo.

Los árboles nucelares son genéticamente uniformes, en ellos se reproduce el genotipo de la planta que le da origen sin las variaciones provenientes de la segregación en la esporogénesis o de la recombinación en la fertilización (Maheshwari y Ranga Swamy, 1958 citado por Martínez, 1988). Sin embargo, diferencias fenotípicas son observadas y no solo son debidas al carácter juvenil, es posible que la polinización y particularmente la fertilización pueden influenciar la expresión genética de los embriones nucelares (Button y Kochba, 1977 citado por Martínez, 1988).

Esta variabilidad limitada de los clones nucelares no presenta problemas cuando son empleados como patrones. No obstante, si son utilizados como clones libres de virus, esta variabilidad es indeseable y obliga a su evaluación agronómica antes de ser utilizadas (Juarez y col. 1976, Navarro y Juárez, 1977 citado por Martínez, 1988).

2.2 Importancia económica

En el año 2011, los países exportadores de fruta cítrica fresca del hemisferio Sur produjeron un total de 6,49 millones de toneladas, un descenso del 0,6 % respecto al 2010 y del -17,3 % si se lo compara con 2007. El resultado productivo no fue el mismo para todas las especies. Mientras la producción de limón creció un 18% (1,98 millones de t) y la de pomelos un 12% (522 mil t), las de mandarinas y naranjas –las especies más importantes en el comercio internacional- se redujeron 9,5% (948 mil t) y 9% (3 millones de t) respectivamente, con relación al año 2010 (Ver tabla 1). A la menor producción se sumaron dificultades en el comercio internacional que afectaron aún más los volúmenes exportados, un -4% menos, 2,18 millones de toneladas en el 2011 frente a 2,27 millones en el 2010. La única especie que aumenta su participación es el pomelo, explicado por las 50 mil t más que exportó Sudáfrica en el 2011. Las naranjas cayeron un -8,5 % y las mandarinas -6,23% por ciento hasta las 370.011 toneladas (Bruno, 2011).

Las mayores áreas productoras de fruta fresca son España, Estados Unidos de América (U.S.A.), Italia, Japón, China y México, mientras que para la fruta procesada destacan Brasil y U.S.A. En Venezuela, ocupan el segundo lugar en volumen de producción, luego de las musáceas y las principales áreas citrícolas se hallan en los estados Carabobo, Yaracuy, Monagas y Miranda. El consumo fresco solo supera el procesamiento, fuera de la zafra principal, la cual se ubica durante el primer semestre del año. Las características de las frutas son altamente variables, con tendencia a una calidad media o baja (Aular-Rodríguez, 2007).

El principal destino de los cítricos es el mercado fresco y para el procesamiento industrial. El 60% se comercializa en fresco y cerca de tres mil toneladas de concentrado de

mandarina lo consume la industria. También se consume en jugos, néctares, vinos, gelatinas, tortas, mermeladas, jaleas. El consumo per cápita en fresco es de 12 kilos/año. (Martínez, 2009).

Tabla 1. Mandarinas: producción efectiva y prevista (F.A.O, 2010)

	EFECTIVA			PREVISTA	TASAS DE CRECIMIENTO	
	Promedio 1987-1989	Promedio 1997-1999	2001	2010	1987-89 a 1997-99	1997-99 a 2010
	<i>miles de toneladas</i>			<i>porcentaje anual</i>		
MUNDO	9 811	14 969	14 287	17 010	4,3	1,1
DESARROLLADOS	4 927	4 640	4 569	5 308	-0,6	1,1
América del norte	368	461	421	450	2,3	-0,2
Europa	1 783	2 448	2 585	2 966	3,2	1,6
Oceanía	39	71	85	92	6,3	2,2
Otros países desarrollados	2 738	1 659	1 478	1 800	-4,9	0,7
EN DESARROLLO	4 884	10 329	9 719	11 702	7,8	1,0
África	491	584	411	726	1,8	1,8
América latina y el caribe	1 155	1 754	2 340	2 076	4,3	1,4
Cercano Oriente	544	1 004	1 020	1 140	6,3	1,1
Lejano Oriente	2 694	6 987	5 948	7 760	10,0	0,9

El valor nutritivo y medicinal de los cítricos se deriva de su contenido de vitaminas (Ver tabla 2), minerales y fibra. La vitamina C, ayuda al sistema inmunológico y mejora la absorción del hierro. Su alto contenido de potasio le permite desempeñar un papel importante en la regulación del volumen sanguíneo, en el control de la hipertensión y de la acumulación de agua en los tejidos. El consumo fresco, aporta un buen contenido de fibra que ayuda a la digestión, previniendo el estreñimiento; igualmente reduce la absorción de las grasas digeridas, disminuyendo el nivel de colesterol y, por consiguiente, el riesgo de padecer una enfermedad coronaria.

Por otra parte, sus aceites y esencias son muy utilizados por la industria farmacéutica y de cosméticos, debido a sus características aromáticas, protectoras y desinfectantes. En relación a sus propiedades terapéuticas, es un equilibrante del sistema nervioso central.

Tabla 2. Composición centesimal de las mandarinas (F.A.O., 2008)

Valor nutricional de la mandarina en 100 g de	
Agua (g)	87
Proteínas (g)	0.8
Lípidos (g)	0.2
Carbohidratos (g)	11.6
Calorías (Kcal)	46
Vitamina A (U.I.)	420
Vitamina B1 (mg)	0.07
Vitamina B2 (mg)	0.02
Vitamina B6 (mg)	0.07
Ácido nicotínico (mg)	0.2
Vitamina C (mg)	31
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	110
Calcio (mg)	40
Magnesio (mg)	11
Manganeso (mg)	0.04
Hierro (mg)	0.4
Cobre (mg)	0.1
Fósforo (mg)	18
Azufre (mg)	10
Cloro (mg)	2

En Venezuela está ampliamente distribuido y cultivado por el sabor dulce de sus frutos y el abundante jugo que contienen, además, por su facilidad para pelarlas. Hay muchas variedades como: Dancy, Cleopatra y Clementinas (INIA, 2012).

2.3 Cultivo tradicional de la mandarina

El sistema de cultivo dominante son los huertos menores a dos hectáreas, atomizados en muchas fincas, y pocos son los cultivos comerciales tipo monocultivo. Tiene para su cultivo los mismos requerimientos que los demás cítricos, es decir, suelos francos o sueltos; se puede sembrar durante todo el año, pero preferible a la entrada de la lluvias; ya que es un cultivo que necesita riego. Se siembra en hileras, separadas cada planta por unos seis metros. Se propaga por semillas, aunque se hacen injertos para mantener las diferentes variedades (Aular, 2006a).

2.3.1 Cultivo tradicional de la mandarina en Venezuela.

Cuando analizamos el origen del material vegetal a ser propagado, su fitosanidad, la desinfección de sustratos, y las herramientas que son usadas en los viveros venezolanos, nos encontramos con una situación bastante precaria. No se garantiza que el material propagado pertenezca a clones élites, altamente productivos, tampoco se certifica la fitosanidad de las plantas, en lo que se refiere a virus y sub-virus y adicionalmente los sustratos no son esterilizados adecuadamente. En pocas palabras, el productor corre un alto riesgo de adquirir plantas de baja producción y contaminadas. La no certificación de plantas libres de virus y enfermedades, ha originado el resurgimiento de problemas ya superados como Cachexia, Psorosis y Gomosis (Aular, 2006).

Los principales patrones o porta injertos usados en Venezuela son: a) Mandarina Cleopatra, *C. reshni*; b) Citrumelo Swingle (*C. paradisi* X *P. trifoliata* L.) Limón Volkameriano, *C. volkameriana* (Wagner *et al.*, 2002). Este último porta injerto, hasta hace una década y media, fue el patrón predominante pero en la actualidad predomina el uso de la mandarina Cleopatra, ya que permite el trazado de marcos de plantación más estrechos. (Aular, 2011)

En Venezuela, el manejo de las frutas cítricas durante la cosecha, esta concentrado de enero a mayo, y la postcosecha es precaria, bien sea por la ausencia de normas de selección, clasificación o por las bajas exigencias del mercado nacional. Existen algunas empacadoras que aplican selección y clasificación de frutas para abastecer algunas cadenas de supermercados, pero la participación de este sector es minoritaria (Aular, 2006).

El cultivo *in vitro* de cítricos ha sido una metodología de gran utilidad para complementar los programas de mejoramiento genético de estas especies. Diversas estrategias de regeneración han sido establecidas para estos propósitos.

24. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es definido como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, a los cuales se les proporcionan artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Pierick, 1990)

Desde que se postuló la teoría Schwann y Scheiden (1938-39), en la cual la célula se describe como la unidad biológica más pequeña con capacidad de desarrollarse, y los

intentos realizados por Haberlandt en 1902 de cultivar células aisladas de plantas, se desarrolló la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*: la totipotencia celular, definida como la capacidad que tienen las células vegetales dadas las condiciones apropiadas de poder desarrollarse en una planta completa por cuanto posee en su material genético toda la información necesaria para la morfogénesis (Pierik, 1990).

El cultivo *in vitro*, constituye dentro de la biotecnología vegetal, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado al mejoramiento de especies vegetales. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología, genética y bioquímica hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* y la ingeniería genética (Jiménez, 1998).

Según Savita en el 2011, el cultivo *in vitro*, además de mejorar las variedades existentes, tiene el potencial de la regeneración a gran escala de nuevas plantas en un lapso de tiempo comparativamente más corto comparado con métodos convencionales de cultivo, y adicionalmente el desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos es esencial para ser usado rutinariamente como una herramienta de investigación para el mejoramiento de estas plantas.

El sistema *in vitro* puede ser también útil en generar material *in vitro* de plantas en fase adulta para la transformación genética, estudios patológicos y conservación de germoplasma *in vitro*, (Marutani Hert et al. 2010; Pérez-Tornero et al.2010, citados por Germana, 2011).

Actualmente pueden identificarse cinco etapas bien definidas en los procesos de propagación *in vitro*, cada una con objetivos específicos: Fase 0: preparativa, Fase I: establecimiento o iniciación de los cultivos, Fase II: multiplicación, Fase III: enraizamiento y Fase IV: aclimatización (Krikorian, 1991).

La fase preparativa inicialmente fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban en la fase I. En esta etapa se debe tener en cuenta el estado fitosanitario, genético y fisiológico de la planta madre, ya que tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes (Jiménez, 1998^a; Debergh y Maene, 1981, citado por Jiménez, 1998). El objetivo de esta fase es lograr el establecimiento de cultivos asépticos y fisiológicamente vigorosos con los cuales se inicia el proceso de multiplicación. En esta etapa, es importante considerar el tamaño y la edad fisiológica del explante (Jiménez, 1998).

La fase II, se caracteriza por la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes ya establecidos *in vitro*. La proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro* puede lograrse con el uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y un adecuado manejo del proceso *in vitro* (Orellana, 1998).

La fase III corresponde al enraizamiento, que tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir a las condiciones del trasplante siendo capaz de absorber nutrientes del suelo (Krikorian, 1991). Para lograr la mayor eficiencia biológica, económica y productiva, se deben manejar adecuada y armónicamente varios factores, entre

ellos: medios de cultivos simples y de ser posible en estado líquido, uso de reguladores de crecimiento y aumento en la concentración de sacarosa; entre otros (Orellana, 1998).

En la fase de aclimatización corresponde llevar las plantas al medio ambiente, y es considerada como una fase crítica en la propagación *in vitro* (Krikorian, 1991). Durante las primeras dos semanas después del trasplante a tierra es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales, donde prácticamente se requiere simular en este período las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones (Agramonte y col., 1998).

Entre las primeras técnicas empleadas en el cultivo de tejidos vegetales, que permiten la regeneración y multiplicación de plantas a partir de un explante en particular, se encuentran la micropropagación, organogénesis, microtuberización, microinjertos, cultivo de embriones, cultivo de anteras, cultivo de células y protoplastos, además de la embriogénesis somática (Krikorian, 1991).

2.4.1 Cultivo *in vitro* mandarina

2.4.1.1 Micropropagación clonal mediante yemas y microesquejes

La micropropagación clonal es considerada como la técnica de propagación vegetativa *in vitro* que implica la producción de plantas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta de la que se derivan (Krikorian y col., 1991). A través de esta técnica, un explante (yemas o microesquejes) de una planta madre, es cultivado en condiciones asépticas, generando individuos con una descendencia uniforme, denominados clones (Castillo, 2004).

2.4.1.2 Organogénesis *in vitro*

La organogénesis *in vitro* ha sido clasificada dependiendo si el proceso es directo o indirecto (Hicks, 1994). En el tipo directo, los explantes son competentes para responder a la diferenciación por medio del estímulo con reguladores del crecimiento, y no requieren la formación previa de callo antes de inducir la respuesta. Por el contrario, en el tipo indirecto, la regeneración de órganos ocurre previa formación de callo en el explante.

La mayoría de los meristemoides obtenidos en la organogénesis se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante, y bajo condiciones apropiadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias (Bonnett y col., 1996, citado por Litz y Jarret, 1991).

La organogénesis está regulada por el balance auxina/citoquinina en el medio de cultivo. Medios con una relación alta auxina/ citoquinina inducen la formación de raíces, mientras una baja relación de auxina/citoquinina induce la formación de vástagos y una relación intermedia induce la formación de callos, Christianson y Warnick, 1983 (citados por Mercier y col.2003).

La organogénesis indirecta tiene interés en programas de selección en los que se requiere variabilidad genética adicional a la ya existente en la naturaleza como por ejemplo: la resistencia a antibióticos, herbicidas, sequía, plagas y enfermedades entre otros. La organogénesis directa se utiliza para la propagación *in vitro* de plantas élites (Menéndez y col., 2003).

Actualmente existen diferentes reportes que se han desarrollado métodos para la organogénesis *in vitro* en cítricos como mecanismo de propagación masiva. Entre estos se

encuentran el estudio de: Singh y colaboradores (1994) obtuvieron múltiples vástagos (7 vástagos/nudo) desde microesquejes (2-3cm) de plantas maduras (5-6 años de edad) de *Citrus reticulata* y *C. limón* al cultivarlos en medios MS, suplementados con 1 mg/L de BA, 0,5 K y 0,5 ANA. Lograron el enraizamiento de los brotes (2cm de largo) en medios MS suplementados con 0,25 BA, 0,5 ANA y 0,5 IBA a la séptima semana del cultivo, en ambas especies de Citrus. Las plántulas fueron establecidas en tierra exitosamente.

Normah y colaboradores (1997) lograron establecer un exitoso sistema de organogénesis directa en *Citrus hamilii*, lo obtuvieron partiendo de segmentos de hipocótilos cultivados en medios Murashige y Skoog (MS) con 0,5-2,5 mg/l 6 benciladenina (BA). El enraizamiento de los vástagos regenerados, fue mejor en medios MS suplementado con 0,5 mg/L de ANA. *In vitro* y *ex vitro* las plántulas enraizadas sobrevivieron (en un rango de 83,3) después las transfirieron a una mezcla de suelo que constó de arena, material orgánico (1:1:1) y las mantuvieron en invernaderos.

En el año 2000, Moreira y colaboradores lograron establecer un sistema de organogénesis en *Citrangue troyer* (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), esto lo obtuvieron usando como explantes segmentos de epicótilos cultivados en medios MS suplementados con una concentración óptima de BA, que fue de 1mg/l. Obtuvieron un aproximado de 6 vástagos por explante. Los resultados indicaron que el número de brotes aumento en cultivos incubados en luz en comparación a cultivos incubados en la oscuridad. Observaron que en la oscuridad incremento marcadamente la formación de callos. Los autores reportaron que la organogénesis directa se logro en medios MS sin la adición de hormonas a bajos porcentajes, pero que este promedio incrementó en medios suplementados con BA.

Al-Khayri y colaboradores (2001), lograron la micropropagación *in vitro* de *Citrus aurantifolia*. La mayor multiplicación (8 vástagos por nudo), la obtuvieron usando como explantes microesquejes, cultivados en medios MS suplementados con 1 mg/L BA y 0,5 mg/L cinetina. La elongación de los vástagos pareció favorecida en medios con 0,25 mg/L BAP combinado con 1 mg/L cinetina. Obtuvieron el 56% de enraizamiento en medios suplementados con IAA. Las plantas sobrevivieron en sol y exhibieron crecimiento normal en el invernadero.

Al-Bahrany (2002) evaluó el efecto de las fitohormonas en la multiplicación de vástagos *in vitro* y enraizamiento en limón *Citrus aurantifolia*. Para ello usaron como explantes microesquejes cultivados en medios MS que contenía 2 mg/L BA, 1 mg/L cinetina (K) y 0,5 mg/L ANA. Obtuvieron el mejor resultado que fue nueve vástagos por nudo. El mas alto porcentaje de enraizamiento lo obtuvieron en medios que contenían o 1 mg/L de ANA solo o 0,5 mg/L de ANA combinado con 2 mg/L de IBA. El 82 % de las plántulas regeneradas sobrevivieron a la aclimatización, exhibieron crecimiento normal en suelo bajo condiciones de invernadero.

Huang y colaboradores (2002) estudiaron el efecto de las auxinas en los medios para la inducción de callos, usando como explantes segmentos de hojas de *Citrus grandis* en medios MS suplementadas con ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4), ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2-metoxi 3, 6 diclorobenzoato, ácido 2,4,5-triclorofenoxyacetico, ácido 2-Metil-4-clorofenoxiacético, señalando que la mejor auxina para inducir callos organogénicos viables fue a bajas concentraciones (1 y 2 mg/L) de 2,4 D y luego la mas alta formación de vástagos (13 vástagos/explantes) lo lograron con 1,5 mg/L de BA.

Almeida y colaboradores (2002) establecieron un protocolo para optimizar la organogénesis *in vitro* y la regeneración de plantas en *Citrus sinensis* y *C. limón*. La inducción de la organogénesis fue hecha introduciendo segmentos de epicotílos en medios MT con 25 g/L de sacarosa y diferentes concentraciones de BA. Después cuando las yemas crecieron, los vástagos los transfirieron a medios MT con 1 mg/L de ANA o IBA, para el enraizamiento. Los mejores resultados lo obtuvieron con 1 mg/L de BA para la inducción de yemas y 1 mg/L de IBA para el enraizamiento de los tres cultivares estudiados. Reportaron en su trabajo que estos protocolos eran sustentables para asociaciones con experimentos de transformación genética de estos cultivares.

Singh y colaboradores (2003) realizaron una comparación entre plántulas micropropagadas *in vitro* y las obtenidas por semillas de variedades de Citrus. Reportaron que en general el estadio inicial de crecimiento de las plántulas germinadas era más vigoroso que las plántulas micropropagadas, pero tiempo más tarde las plántulas micropropagadas se volvían más robustas. Los resultados indicaron que los vástagos y raíces crecieron más altos en plántulas germinadas que las micropropagadas en la etapa inicial. Las diferencias de crecimiento podría ser atribuido al hecho de que las plántulas micropropagadas carecen mas de los nutrientes que le proporciona la semilla (alimento almacenado en los cotiledones). Sin embargo a un año de edad las plántulas micropropagadas se mostraron mejor que las germinadas. Las plántulas micropropagadas tuvieron significativamente más alto la altura, longitud de las raíces, numero de hojas, numero de raíces secundarias y el peso de la planta que las germinadas.

Almeida y colaboradores (2003) lograron establecer un protocolo para la organogénesis adventicia y la transformación genética de variedades de naranja (*Citrus*

sinensis L.) usando como explantes segmentos de entrenudos desde plantas adultas mantenidas en invernaderos. La organogénesis fue inducida en medios DBA3 (Medio basal MT suplementado con 20 ml/L de agua de coco) suplementado con 1.0 mg/L BA+ 0,5 mg/L ANA, en la oscuridad a 27 ± 2 °C hasta cuando se formaron yemas adventicias y luego se transfirieron a un fotoperíodo de 16h. A través de un análisis histológico mostraron una formación indirecta de yemas adventicias desde callos que proliferaron en los extremos cortados del explante.

Hassanein y Azooz (2003) germinaron eficientemente semillas de *Citrus reticulata* en medios MS suplementado con 0,5 mg/L de BA en comparación a suelo. Luego de estas plántulas obtuvieron segmentos de vástagos y los cultivaron en medios MS suplementado con 1 mg/L BA, 0,5 mg/L K y 0,5mg/L ANA, donde crecieron y se multiplicaron los vástagos. El enraizamiento fue mejor bajo condiciones de luminosidad que en oscuridad. Lograron exitosamente la transferencia a suelo de las plántulas obtenidas por germinación y a partir de segmentos de vástagos después de tres días de aclimatización.

Muhammad y colaboradores (2005) lograron la inducción *in vitro* de múltiples vástagos desde microesquejes en variedades de Citrus. Encontraron que la producción de vástagos es directamente proporcional a la adición de BA en los medios basales, donde el mayor porcentaje de inducción de vástagos (86.04%) fue con 10 mg/L de BA y lo obtuvieron al emplear como explantes microesquejes en varias variedades de *Citrus*.

Mukhtar y colaboradores (2005) lograron la regeneración y la inducción de múltiples vástagos en *Citrus reticulata*. Para ello emplearon como explantes entrenudos cultivados en medios MS suplementados con 1 mg/L de BA y 1,5 de cinetina. Los

promedios más altos fueron 1,5 brotes/explante y 0,5 brotes/explante al emplear cinetina y BA respectivamente.

Yang y colaboradores (2006), establecieron un sistema eficiente de regeneración *in vitro* de plantas de *Fortunella crassifolia*, encontraron que el mejor explante fue segmentos de epicotílos plantados verticalmente con una frecuencia de regeneración de 1,48 vástagos/explante en medio MS suplementado con 5 mg/L 6-benciladenina (BA), lograron 74% de enraizamiento en medio MS (50%) suplementado con 0,1 mg/L ácido 1-Naphthalenoacético, 2 mg/L cinetina y 0,5 g dm⁻³ carbón activado.

Shawkat, A. y Mirza B (2006) evaluaron el efecto de varias concentraciones y combinaciones de 2,4D, BA y ANA en la regeneración de rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) a partir de raíces y microesquejes. Observaron que la respuesta óptima de inducción de callo se logró en medios MS, suplementados con 1,5mg/L 2,4D para todos los explantes, siendo los segmentos de tallo los que mostraron la mejor respuesta (92%). La máxima respuesta en cuanto a la regeneración de los brotes (70%) fue observada en medios MS suplementados con 3 mg/L BA. La regeneración de vástagos directos fue más alta en explantes de segmentos de vástagos en medios MS con 3 mg/L BA. El enraizamiento lo lograron en medios MS suplementado con 0,5 ANA obteniendo 70% de respuesta.

Almeida y colaboradores (2006) caracterizaron la histología de la organogénesis adventicia *in vitro* en *Citrus sinensis*. Para lograr la organogénesis utilizaron como explantes segmentos de epicotílos cultivados en posición horizontal en medios MS suplementados con 1.0 mg/L benciladenina. En su trabajo demostraron que las yemas

adventicias se originaron directamente desde el cambium, en solo uno de los extremos cortados del explante.

Zeng y colaboradores (2009) reportaron alta eficiencia en la regeneración *in vitro* desde segmentos de epicotílos de *Citrus reticulata*. Lo lograron usando como explantes segmentos de epicotílos cultivados en medios MS suplementados con BA (2mg/L) y 30 g/L de sacarosa bajo condiciones de luz. Obtuvieron una frecuencia de regeneración de vástagos 72, 5% y 7,8 brotes por explantes. Los vástagos regenerados los dispensaron en medios líquidos MS (50%). El 80% de los vástagos enraizaron, con un rango de 2.0 raíces por vástagos. En el proceso de aclimatización lograron un 100% de las plantas.

Khan y colaboradores (2009) lograron la regeneración y caracterización de plantas derivadas del cultivo *in vitro* de hojas de dos cultivares de naranja. En su trabajo ellos cultivaron los explantes en un medio de inducción de vástagos, en medios MT suplementado con 0,5 mg/L BA + 0,5mg/L Cinetina + 0,1.mg/L ANA que fue el medio que mostró ser el mas efectivo para la inducción de vástagos desde explantes de hojas. Observaron que el cultivo de hojas maduras tuvo una mejor capacidad de regeneración de vástagos en comparación con las hojas menos desarrolladas. Las dos condiciones de luminosidad que usaron allí, no causaron diferencias significativas en la regeneración de vástagos. Las observaciones fenotípicas y análisis del ADN polimórfico amplificado confirmaron que todas las plantas regeneradas de ambos genotipos fueron genéticamente idénticas a su planta donadora, sugiriendo ausencia de variación genética detectable en las plantas regeneradas. Demostraron que la iniciación directa de plantas desde explantes de hojas puede llevarse a cabo exitosamente.

Nafees y colaboradores (2009) obtuvieron organogénesis indirecta en Kinnow mandarin trabajando con segmentos de hojas de plantas germinadas *in vitro*, donde la inducción de los callos se realizó en medios MS suplementados con BA+GA (1mg/l) respectivamente + 2,4 D (0,5mg/L) + prolina (5mg/L) y luego un 77% regeneraron vástagos en medio MS con BA + GA cada uno 1mg/L + ANA (0,5mg/L) + prolina (5mg/L).

Pérez y colaboradores (2010), establecieron un simple y eficiente protocolo para la micropropagación de cultivos de limón desde microesquejes maduros de *Citrus limón*. La máxima multiplicación de brotes la obtuvieron en medio MS suplementado con BA (2 mg/L) y GA (1mg/L) con un promedio de 2,4 vástagos por explantes. Posteriormente, el máximo porcentaje de enraizamiento se obtuvo en medio MS suplementado con 3 mg/L IBA.

Germana y colaboradores (2011) evaluaron aspectos de una eficiente organogénesis *in vitro* de Carrizo citrange (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) (en términos de yemas adventicias y la producción de vástagos obtenidos a través de la organogénesis *in vitro* desde segmentos de epicotílos) y encontraron que la mejor combinación para atribuir una buena respuesta de organogénesis directa en Carrizo citrange fue que 1 cm de longitud de segmentos de epicotílos se cultivaran en posición horizontal, en medios MS suplementados con 1mg/L de BA, obteniendo un promedio de (2,8) brotes/explante, lo que confirma a BA como una citoquinina eficiente en la organogénesis *in vitro*.

Savita y colaboradores (2011) desarrollaron un eficiente protocolo de micropropagación de *Citrus jambhiri* usando cotiledones como explante. La máxima

inducción de callos (91,6%) lo observaron en medio MS suplementado con 2,4D (2mg/L) en combinación con extracto de maltosa (500mg/L). Posteriormente los callos de color verdoso y de mejor desarrollo, fueron cultivados en medios MS para la regeneración, la máxima regeneración de vástagos (87,5%) fue con BA (3mg/L). El enraizamiento de brotes alcanzo un 91,67% en MS (50%) suplementado con ANA (0,5mg/L), mientras que en aclimatización las plantas alcanzaron 67% de sobrevivencia.

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis en *Citrus reticulata* (mandarina) a partir de segmentos de hojas y entrenudos.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Establecer el proceso de germinación *in vitro* a partir de semillas de *Citrus reticulata*. Así obtener material vegetal en condiciones asépticas para el proceso de propagación *in vitro*.
- 3.2.2 Establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Citrus reticulata* a partir de microesquejes.
- 3.2.3 Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en el establecimiento de la organogénesis *in vitro* en *Citrus reticulata* a partir de segmentos de entrenudos y hojas.

- 3.2.4 Comparar la respuesta organogénica *in vitro* de segmentos de hojas y de entrenudos provenientes de plantas de *Citrus reticulata* mantenidas en condiciones *in vitro*.
- 3.2.5 Determinar a través de estudios histológicos la naturaleza del proceso morfogénico.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Germinación de semillas de *Citrus reticulata*

4.1.1 Material Vegetal: las semillas se obtuvieron directamente de la fruta fresca, compradas en los mercados.

4.1.2 Desinfección de las semillas

Una vez seleccionadas las semillas de mandarinas, se hicieron dos lavados sucesivos con agua y jabón comercial, luego de un lavado con jabón bactericida (Betadine) durante 10 minutos, un lavado con cloro comercial al 20% durante 20 minutos, dos lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Para la siembra se tomaron 30 semillas que se sembraron con cubierta seminal y otro grupo de 30 semillas que si se procedió a quitarle la cubierta seminal.

4.1.3 Medio de germinación

El medio utilizado para la germinación estaba constituido por las sales del medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con 1 mg/L de tiamina-HCl, 1 mg/L piridoxina-HCl, 1 mg/L ácido nicotínico, 2 mg/L glicina y 100 mg /L mio-inositol y 30 g/L de sacarosa. El pH del medio fue ajustado a 5,8 con NaOH, se añadieron 8 g/L de agar como agente gelificante. Estos medios fueron distribuidos en frascos de vidrio de 30 ml. Se esterilizaron durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C y 15 libras de presión.

4.2 Multiplicación de microesquejes

4.2.1 Material Vegetal: una vez obtenidas las plantas germinadas *in vitro* de *Citrus reticulata* con una edad de 4-5 semanas aproximadamente, se procedió a cortar los microesquejes y se sembraron en medios de multiplicación para aumentar el número de plantas donantes de explantes.

4.2.2 Medios de cultivo: durante la fase de multiplicación, se sembraron segmentos de microesquejes en medio básico definido en (4.1.3), al cual se le añadió diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, detalladas en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de los medios para la multiplicación de vástagos en *C. reticulata*

Medio de Cultivo	Regulador de crecimiento		
	NAA(mg/L)	BA(mg/L)	GA ₃ (mg/L)
1*	-----	-----	-----
2**	-----	2	1
3***	0,5	1	-----

* Medio control, **Medios reportados por Pérez y col. 2010 ***Medios reportados Almeida y col. 2003.

4.3 Organogénesis de segmentos de hojas y entrenudos

4.3.1 Material Vegetal: al mismo tiempo que se procedió a cortar los segmentos de microesquejes se procedió a cortar los segmentos de hojas y entrenudos de aproximadamente 1cm² provenientes de plantas micropropagadas de mandarinas, mantenidas en condiciones *in vitro*.

4.3.2 Medios de cultivo: durante la fase de inducción de organogénesis, se sembraron segmentos de hojas y entrenudos en medio básico definido en (4.1.3), al cual se

le añadió diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, detalladas en la tabla 4. Estas combinaciones de reguladores de crecimiento se escogieron a partir de experimentos previos hechos en el laboratorio, los cuales arrojaron los mejores resultados, dichos medios se detallan en la tabla 4; los tratamientos se prepararon por duplicado, una serie para la siembra de los segmentos de entrenudos y otra serie para sembrar los segmentos de hojas.

Tabla 4. Composición de los medios para la inducción de organogénesis en *C. reticulata*

Medio de Cultivo	Regulador de crecimiento		
	NAA(mg/L)	BA(mg/L)	K(mg/L)
1*	-----	-----	-----
4**	-----	2	-----
5***	0,1	0,5	0,5

* Medio control, **Medios reportados por Zeng y col. 2009***Medios reportados por Khan y col. 2009.

4.4 Medios de enraizamiento

Una vez que se obtuvieron las plántulas de un tamaño de 2-3 cm aproximadamente, fueron transferidas a un medio MS (50%) sin reguladores de crecimiento (C1), y otro medio MS suplementado con 0,1 mg/L de IBA + 0,5 mg/L de ANA (C2) (Tabla 5).

Tabla 5. Composición de los medios de enraizamiento en *C. reticulata*.

Medio de Cultivo	Regulador de crecimiento		
	NAA(mg/L)	IBA(mg/L)	2,4D(mg/L)
C1*	-----	-----	-----
C2**	0,5	0,1	-----

*Medio de control, ** Medio reportado por Savita y col. (2011).

4.5 Siembra de los explantes

Los explantes provenientes de plantas *in vitro* de *Citrus reticulata* se sembraron en los medios de inducción en cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia a razón de 10 secciones por envase, con cuatro réplicas cada uno, obteniendo un total de cincuenta (40) explantes por tratamiento.

4.6 Condiciones del cultivo *in vitro*

4.6.1 Germinación semillas: Los cultivos fueron incubados en condiciones de luz fluorescente continua a temperatura de 27 ± 1 °C.

4.6.2 Multiplicación a partir de microesquejes: Los cultivos fueron incubados en condiciones de luz fluorescente continua a temperatura de 27 ± 1 °C.

4.6.3 Organogénesis de segmentos de entrenudos: Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento de una temperatura de 25 ± 1 °C, en total oscuridad durante el lapso de tiempo necesario para realizar la inducción de la organogénesis y etapas de la organogénesis.

4.6.4 Organogénesis de segmentos de hojas: un grupo de los cultivos de 40 frascos fue incubado en una cámara de crecimiento de una temperatura de 25 ± 1 °C, en total

oscuridad y otro grupo fue incubado en condiciones de luz fluorescente continua a temperatura de 27 ± 1 °C durante el lapso de tiempo necesario para realizar la inducción de la organogénesis y etapas de la organogénesis.

En las siguientes etapas de la organogénesis, los cultivos fueron incubados en condiciones de luz fluorescente continua, temperatura de 27 ± 1 °C. El repique del material vegetal fue realizado cada dos meses.

4.6.4 Organogénesis de segmentos de hojas: una serie de 40 cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento de una temperatura de 25 ± 1 °C, en total oscuridad y otra serie de 40 frascos fueron incubados en condiciones de luz fluorescente continua a temperatura de 27 ± 1 °C durante el lapso de tiempo necesario para realizar la inducción de la organogénesis y etapas de la organogénesis.

Posteriormente, en las etapas siguientes de ambos procesos, los frascos fueron transferidos a condiciones de luz fluorescente continua, temperatura de 27 ± 1 °C. El repique del material vegetal fue realizado cada dos meses.

En las siguientes etapas de la organogénesis, los cultivos fueron incubados en condiciones de luz fluorescente continua, temperatura de 27 ± 1 °C. El repique del material vegetal fue realizado cada dos meses.

4.7 Observaciones

En cada uno de los cultivos se llevaron a cabo análisis cualitativos y cuantitativos semanalmente. Las características cualitativas evaluadas se basaron en los siguientes aspectos: coloración de los explantes, coloración del callo, tipo de callo formado, neoformaciones, hiperhidricidad. Entre las características cuantitativas evaluadas se encontraron: tiempo de respuesta del explante, porcentaje de contaminación de los explantes, porcentaje de explantes con formación de callo, promedio de brotes por explante, promedio de plantas regeneradas por explante, índice de formación de brotes y porcentaje de plantas aclimatizadas.

4.8 Aclimatización

Para la fase de aclimatización, inicialmente se sembraron 3 plantas obtenidas desde microesquejes que enraizaron en medios MS. Luego otro grupo de 10 plantas obtenidas por germinación *in vitro*, con una altura aproximada de 3-6 cm; en esta etapa se utilizó sustrato conformado por tierra negra abonada y arena lavada en una proporción 1:1 y se colocaron durante 15 días en propagadores con alta humedad (80-93% de humedad relativa) y baja luminosidad ($10 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), densidad de flujo fotónico fotosintético (DFF). Luego las plantas fueron transferidas a condiciones de vivero.

4.9 Caracterización anatómica

A fin de establecer la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro*, se llevó a cabo un estudio anatómico del material vegetal de hojas y entrenudos de *Citrus reticulata*.

Los cortes anatómicos se observaron a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2, y se tomaron fotografías en cada caso con una cámara digital SONY de

12.1 mp acoplada al mismo. El cálculo del aumento total de las fotografías fue realizado mediante la multiplicación del aumento del objetivo por el aumento del ocular.

4.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos para cada tratamiento se realizó a través de una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías con la ayuda del programa CaEst 1,2 para Windows XP.

5. RESULTADOS

5.2 Germinación de semillas de *Citrus reticulata*

5.2.1 Establecimiento del cultivo

El método de desinfección utilizado en las semillas resultó ser adecuado para el establecimiento del cultivo, se obtuvo un mínimo porcentaje de contaminación (10%).

5.2.2 Germinación de semillas con cubierta seminal de *C. reticulata*

En semillas con cubierta se obtuvo 0% de germinación, y no se presentó ningún tipo de respuesta durante los tres meses que duró de experimentación (Ver tabla 6). Luego a estas semillas no germinadas se procedió a quitarles la cubierta seminal y se cultivaron en medio MS control. A la semana de cultivo se obtuvo que el 42% de las semillas sí germinaron.

5.2.3 Germinación de semillas sin cubierta seminal de *C. reticulata*

A los 40 días de cultivo se logró un 85% de germinación en las semillas sin cubierta (Fig3). Durante el establecimiento del cultivo *in vitro*, se obtuvo un porcentaje mínimo de contaminación, observándose en el caso de la germinación un 90% de semillas libres de contaminación y 87% de respuesta germinativa en medio MS con un número promedio de plantas 1,99 por semilla (Fig.2).

Tabla 6. Germinación de semillas de *C. reticulata* con y sin cubierta

Semillas	% de germinación	N° plantas/semilla
Con cubierta	0	0
Sin cubierta	88%	1,99

Las semillas resultaron ser un material vegetal adecuado para propagación masiva de plantas *C. reticulata*.

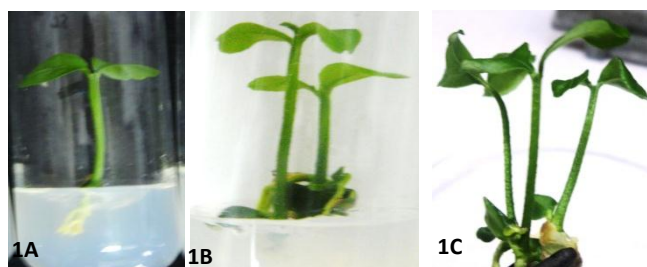


Fig.2 Plantas obtenidas por germinación *in vitro* de *C. reticulata*. A, B y C) Una, dos y tres plantas por semillas

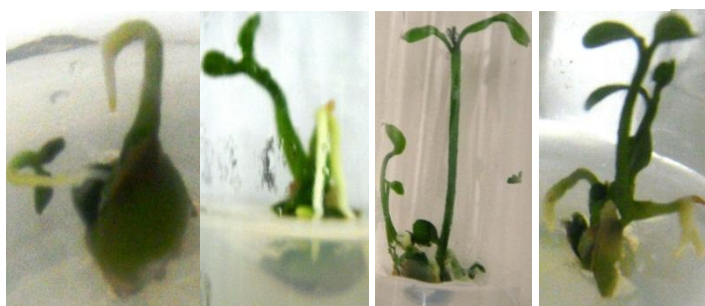


Fig. 3. Diferentes etapas de la germinación de semillas de *C. reticulata*. a) 15 días b) 22 días c) 30 días d) 45 días.



Fig. 4 Grupo de plantas de *C. reticulata* obtenidas por germinación *in vitro* a las cuatro semanas.

5.3 ORGANOGENESIS

5.3.1 Multiplicación a partir de microesquejes de *C. reticulata*

Los explantes cultivados en el medio control sin reguladores de crecimiento (MS1), no presentaron ninguna respuesta en la multiplicación. El 15% de los microesquejes presentaron enraizamiento al mes de cultivados (Fig.13).

En *C. reticulata*, se observaron cambios morfológicos en los explantes a partir de la cuarta semana de cultivo en los dos medios con reguladores de crecimiento (MS2 y MS3), pudiéndose distinguir en MS2 (2 mg/L BA+ 1 mg/L GA₃) al mes de cultivo un 66,66% de multiplicación con un promedio de 4,82 vástagos/explante (Fig. 5 y 6). Se observó la formación de un callo granular de consistencia friable y coloración amarillenta a marrón hacia la base del esqueje (Fig. 6, B y D).

A los dos meses de cultivo, el explante y los callos formados en la base de los mismos comenzaron a mostrar a simple vista indicios de desarrollo de órganos con la aparición de estructuras esféricas de color verde, que luego darían origen a brotes (Fig. 6) o la inducción de la brotación de yemas ya existentes (Fig. 7) se obtuvo un 83,33% de regeneración con un promedio de 7,03a vástagos/explante en el medio MS2.

En medio MS3 se obtuvo el 42,10% de regeneración y 3,2 vástagos/explante, encontrándose un mayor porcentaje de formación de vástagos en el MS2 con respecto al medio MS3 a lo largo de todo el periodo de experimentación.

En el medio MS2 se observaron algunos casos de hiperhidricidad (8%) (Fig. 9) y la formación y desarrollo de nuevos vástagos con hojas muy estrechas (Fig. 8). En el medio MS3 se observó un alto porcentaje de explantes con hiperhidricidad (60%) (Fig.10).

Cualitativamente, la cantidad de callo formado en el medio MS2 fue aproximadamente el doble de la cantidad de callo formado en el medio MS3. En el medio MS3 el callo tenía coloración amarilla y granular, en MS2 la coloración se mostraba blanca y de consistencia friable.

En la fig.11 se observan los nuevos vástagos obtenidos por organogénesis de microesquejes, en desarrollo en medios MS. A los tres meses de cultivo, la nueva planta en desarrollo (Fig. 12). En la fig. 13 se observa la respuesta de enraizamiento de los microesquejes en medios MS sin hormonas.

La multiplicación de los microesquejes respondió satisfactoriamente en los medios suplementados con reguladores de crecimiento, esta respuesta de multiplicación se observó al mes de cultivados los explantes, el mayor porcentaje de inducción (83,33%) se logró en medio MS2 con un promedio de 7,03 vástago por explante (Gráfico 1).

Gráfico 1. Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación en microesquejes de *C. reticulata*

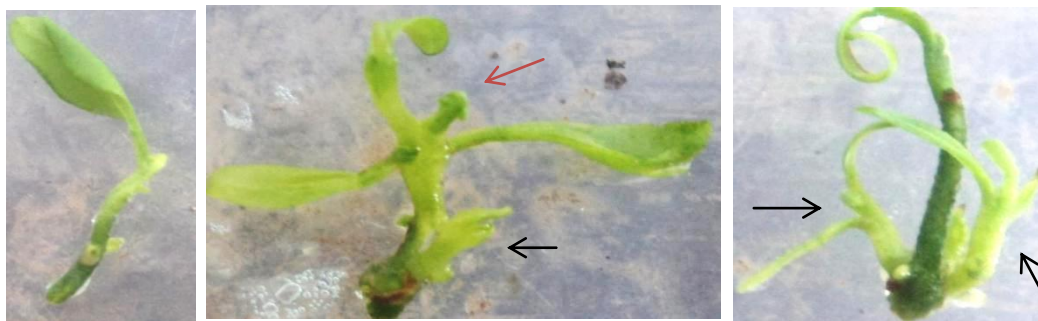
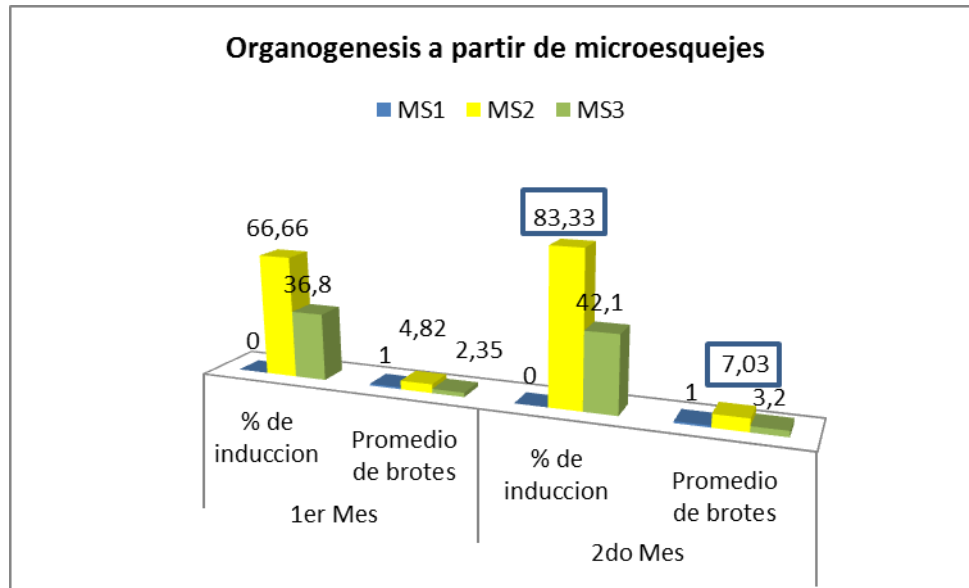


Fig. 5. Segmentos de microesquejes mostrando organogénesis. A) Explante al inicio del cultivo B) Esquejes con formación de un nuevo brote hacia la base (→) e inducción de la brotación de las yemas preexistentes (→). C) Formación de dos nuevos brotes hacia la base del esqueje.

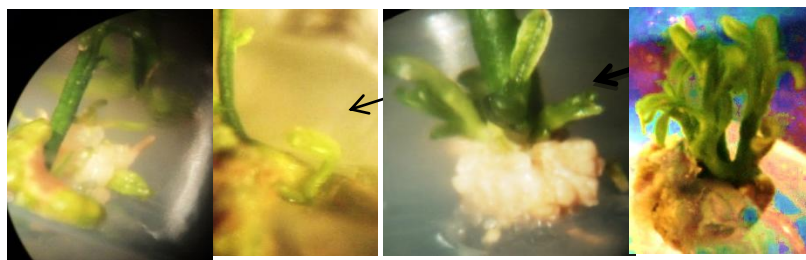


Fig. 6. Formación de órganos de Novo. MS2: A) Callos con iniciación a formar brote. B) Desarrollo del novo a partir de callo C) Formación de múltiples vástagos por esqueje a partir de callo. D) Formación de múltiples plántulas por esqueje.



Fig.7 Segmento de microesquejes donde hay inducción de brotación de yemas por nudo.

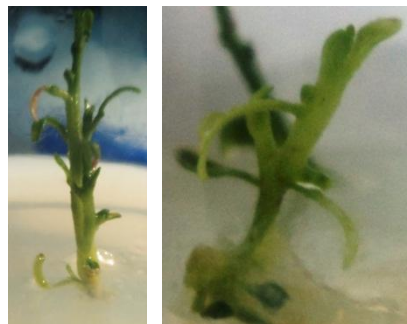


Fig.8 A partir de microesquejes se observa la formación y desarrollo de nuevos vástagos con hojas muy estrechas, 2 meses de cultivo en medios MS2.



Fig.9 Segmentos de microesquejes con hiperhidricidad y deformación de los explantes, MS2 que fue observada en un 8% de los



Fig. 10 Segmentos de microesquejes con alta hiperhidricidad y deformación de los explantes, MS3 que fue observada en un 60%.



Fig. 11 Nuevos vástagos a partir de microesquejes, en desarrollo en medio MS.



Fig. 12 Nueva planta obtenida a partir de la multiplicación por microesquejes en medio de enraizamiento. (3 meses de cultivo)

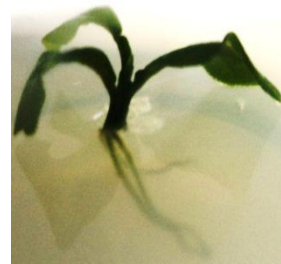


Fig. 13 Microesquejes en medio MS, con enraizamiento.

A los 3 meses de cultivo, los brotes obtenidos presentaron una altura aproximada de 1 cm (Fig.11), estos se separaron del explante madre y se cultivaron en medio MS donde continuaron su desarrollo normal. El desarrollo y crecimiento de los brotes en medio sin hormonas fue lento, cuando los brotes tuvieron una altura de 2 cm en adelante se cambio a medio de enraizamiento (Fig. 12).

Tabla 7. Comparación estadística de la respuesta de organogénesis de mandarina a partir de microesquejes.

Medio cultivo	Promedio Plantas/explante	
	Porcentaje de respuesta	Promedio vástagos/explantes
MS1	0	0
MS2	83,33a	7,03b
MS3	42,10c	3,2d

Letras diferentes indican diferencias significativas, letras iguales indican diferencias no significativas.

5.3.2 Organogénesis de *C. reticulata* a partir de segmentos de entrenudos

Los explantes cultivados en el medio control sin reguladores de crecimiento (MS1), no presentaron ninguna respuesta en la etapa de inducción durante el tiempo de experimentación

En los segmentos de entrenudos, se observaron cambios morfológicos a partir de la segunda semana de cultivo en los dos medios con reguladores de crecimiento (MS4 y MS5), apreciándose la formación de un callo de sellamiento a los extremos de los explantes. Posteriormente se pudo distinguir en todos los casos cierta deformación del explante y cambios de color de verde a amarillo. Al mes de cultivo, en medios MS5 se

observo la formación de un callo granular de consistencia friable y coloración amarillenta a marrón donde se realizaron los cortes anatómicos del explante (Fig. 14 A, B, C y D). A los 60 días de cultivo, se observó la regeneración y desarrollo de vástagos a partir del callo (Fig. 14 C y D).

A los 30 días de cultivo en medio MS5, se observó la formación inicial de yemas y luego la regeneración en vástagos de forma directa, sin la formación previa de callo (Fig. 16). A los 60 días los nuevos vástagos presentaban una altura de 1 cm aproximadamente. A los tres meses de cultivo, se obtuvo un 71% de explantes con callo, de los cuales el 7 % respondió a la formación de vástagos con un promedio de 1 brote/explante.

Los vástagos desarrollados a los 90 días con una altura de 2,5 cm aproximadamente se colocaron en medio de enraizamientos (MS al 50%) (Fig.14F y 14G).

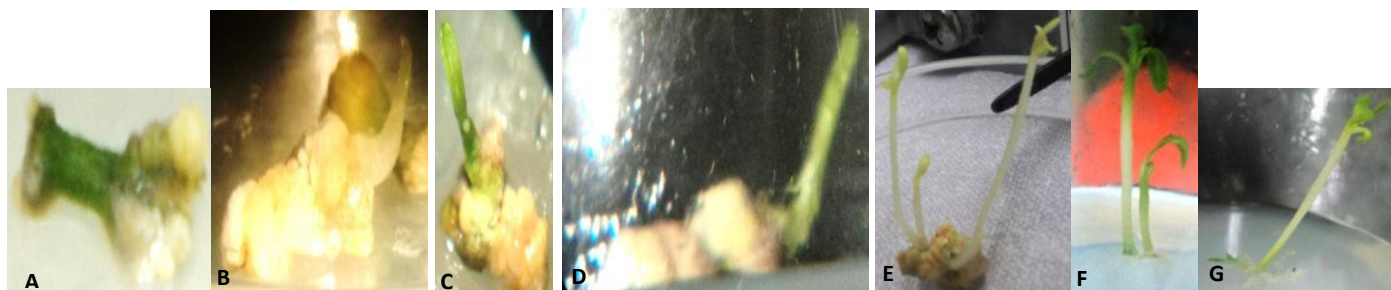
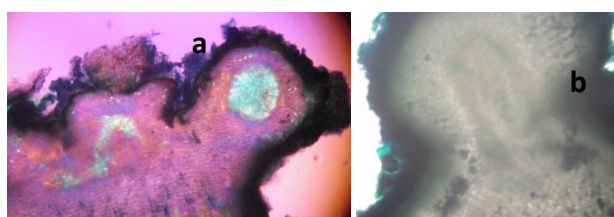


Fig. 14. A) Inicio de la formación de un callo granular, MS5 al mes de cultivo B) Formación de un nuevo brote a partir de callo a los 60 días. C y D) Desarrollo de los nuevo vástagos formados a partir de callo a los 60 días de cultivo. E) Vástagos desarrollados a partir de callo a los 90 días de cultivos en medio MS5. F) Nuevos vástagos separados del callo en medio (50%)

En la figura N° 15, se puede apreciar cortes anatómicos que muestran la formación de meristemoide (a) los cuales se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o tejido circundante y yemas (b) a partir de callo, lo cual indica la naturaleza organogénica indirecta del proceso ocurrido a partir de segmentos de entrenudos.



Un 20 % de explantes, formo vástagos de forma directa con un promedio de 1,4 vástagos por explantes (Fig.16), dichos brotes alcanzaron una altura máxima de aproximadamente 2 cm a los 3 meses de cultivo.



Fig. 16 Formación de vástagos (→) desde organogénesis directa a partir de segmentos de entrenudos cultivados en medio MS5 e incubados en la oscuridad. 60 días de cultivo, MS5.

En los cortes anatómicos de vástago sin inducción para la organogénesis (Fig.17) se caracteriza por una medula heterogénea, por arreglos pronunciados del xilema y floema, en el corte transversal de entrenudo al mes de cultivado en medio de inducción se observo cambios estructurales a nivel del cambium vascular, la región cambial presentó capas de células dividiéndose desde el cambium (Fig.18b) y un meristemoide, compuesta por pequeños paquetes de células meristemáticas. Según Almeida y col. en el 2006, estas regiones meristemáticas se diferencian y desarrollan yemas adventicias.

Después de 3 meses que los nuevos brotes alcanzaron un tamaño de 2 cm se cultivaron en medios MS.



Fig. 17 A. Corte transversal de entrenudo de *Citrus reticulata* sin inducción para la organogénesis (60X).

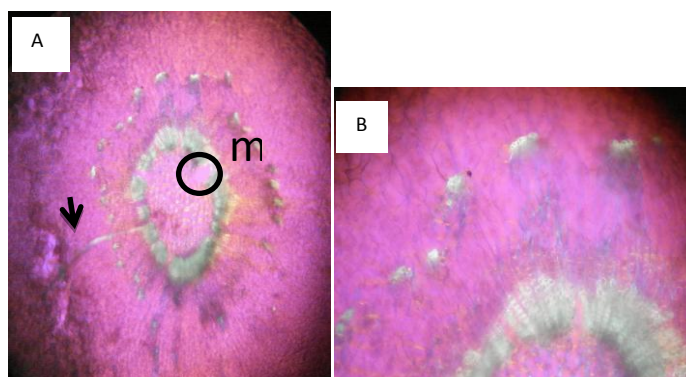


Fig.18 A- Corte transversal de entrenudo de *C. reticulata* cultivados en MS5 a los 30 días de cultivo (300X) el cual se observa (m) Meristemoide y B- Detalle del haz vascular donde se esta dividiendo (450X).

5.3.3 Organogénesis de segmentos de hojas de *C. reticulata*

Después de 90 días de tratamiento, los segmentos de hojas cultivados en el medio MS4 e incubados en la oscuridad, no mostraron ningún cambio morfológico, y por lo tanto ninguna respuesta. En medio MS5 se observaron cambios morfológicos a partir de la cuarta semana de cultivo, pudiéndose distinguir ciertas estructuras organogénicas (Fig.18).

En los segmentos de hojas, se observaron cambios morfológicos a partir de la cuarta semana de cultivo en medio con hormonas, pudiéndose distinguir en algunos casos cierta deformación del explante y cambios del mismo de verde a amarillo. En algunos casos, se observaron protuberancias (estructuras como nódulos globulares) alrededor de los márgenes y vena central de los segmentos de hojas (Fig.19).

A los 90 días de cultivo, se obtuvo en medio MS5 una frecuencia de regeneración de 27 % y un promedio de 2,5 vástagos/explantos (Fig.20). Se observó que la formación directa de vástagos, de 75 a 90 días, con alturas entre 1,5 y 2 cm de largo.

En cultivos donde se sembraron hojas muy pequeñas, de plantas germinadas *in vitro* con 3 o 4 semanas, se observó que no hubo respuesta en la inducción de la organogénesis.

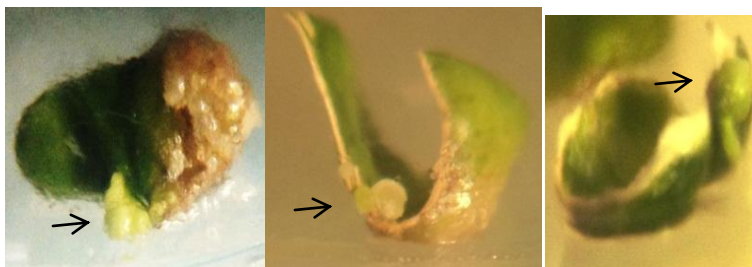


Fig. 18 Formación de estructura para la organogénesis (→) a los 30 días en medios MS5.

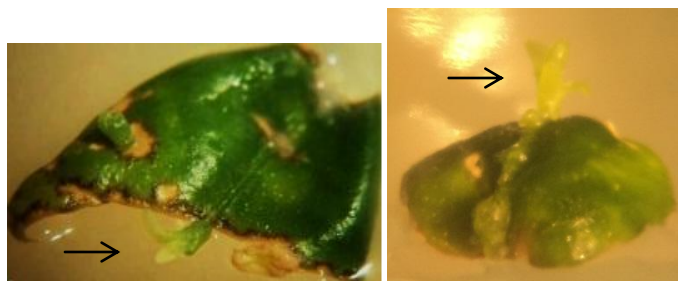


Fig. 19 Formación de nuevos brotes (→), originándose desde la vena central en MS5.



Fig. 20. Formación de nuevos brotes a los 90 días de cultivo en MS5.

De la organogénesis de hoja y entrenudos, observamos (Grafico 2) que al tercer mes en ambos explantes se obtuvo un 77 y 71% de respuesta respectivamente, con una mayor producción de vástagos en hojas (2,5) que en entrenudos (1,6).

Grafico 2. Efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de organogénesis en segmentos de hojas y entrenudos de *C. reticulata*

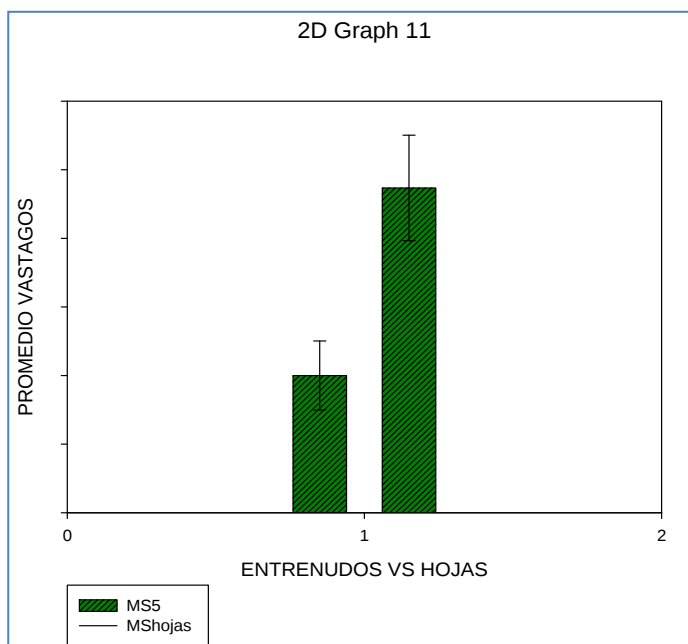
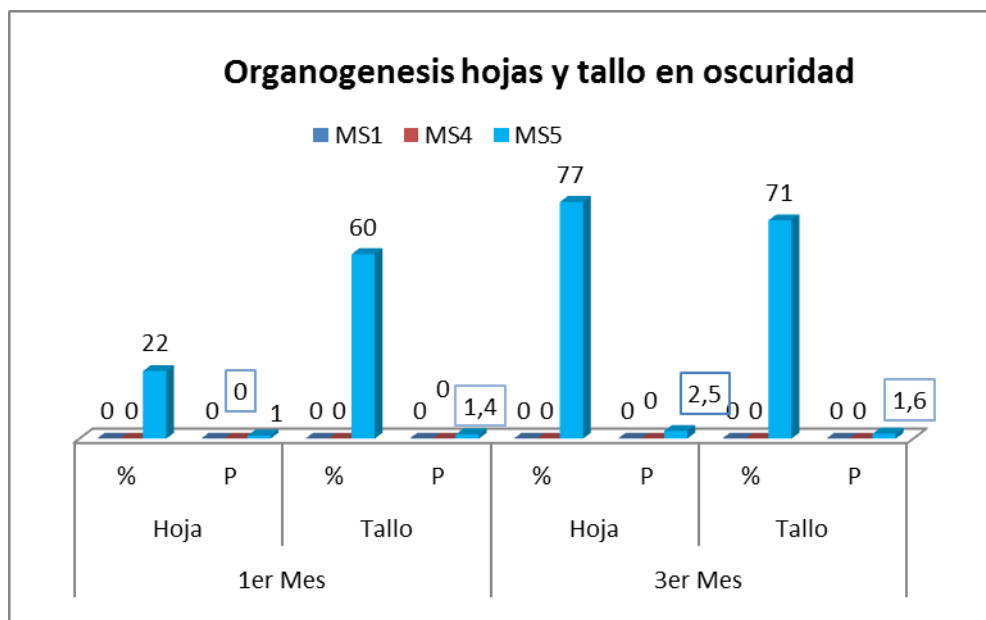
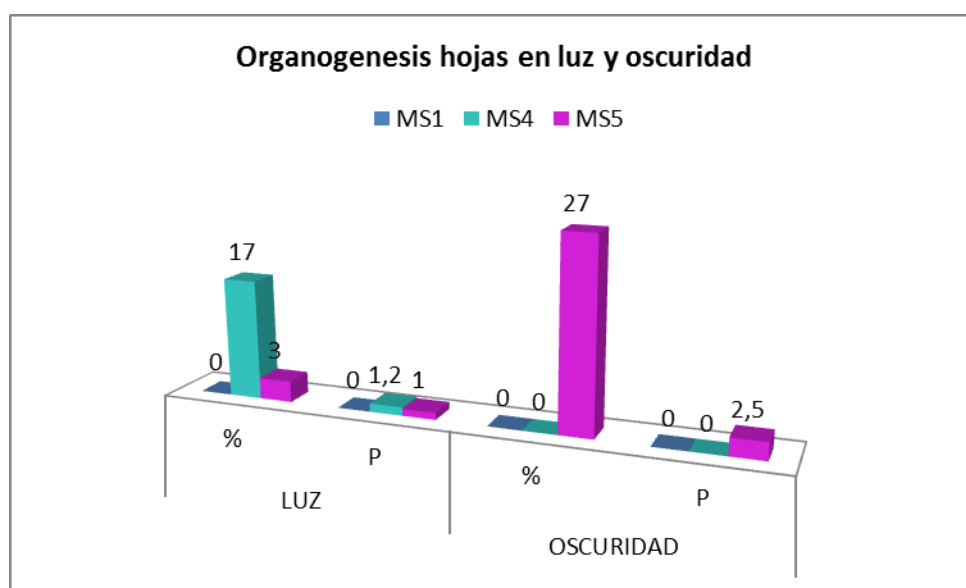


Grafico 3- Comparación estadística de la respuesta de organogénesis desde segmentos de hojas y entrenudos de *Citrus reticulata* incubados en oscuridad.

Cuando comparamos la respuesta de los segmentos de hojas en MS4 y MS5 incubados en luz y oscuridad (Grafico 4), se observó la mayor respuesta en luz cuando se empleó el medio MS4 (17% con un promedio de 1,2 brotes/explante), mientras que la mayor respuesta en oscuridad se encontró cuando se empleó el medio MS5 (27% con un promedio de 2,5 brotes/explante).

Grafico 3. Respuesta organogénica de los segmentos de hojas de *C. reticulata* cultivadas en luz y oscuridad



Después de 30 días de cultivo, los segmentos de hojas cultivados en medio MS4 e incubados en la luz, mostraron cambios morfológicos y una respuesta a la inducción organogénica. A los 60 días de cultivo se obtuvo en medio MS4 una frecuencia de regeneración de 17 % de explantes con vástagos y un promedio de 1,2 vástagos/explante (Fig.21).

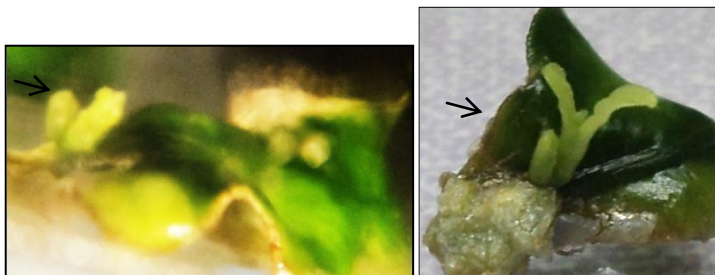


Fig. 21. Formación de vástagos (→) directos a partir de segmentos de hojas incubados en luz, MS4: A) 1 mes de cultivo y B) 3 meses de cultivo.

En medio MS5 en luz, se observaron cambios morfológicos a partir de la cuarta semana de cultivo, pudiéndose distinguir ciertas estructuras organogénicas, obteniéndose un porcentaje de repuesta de 3% y un promedio de 1 vástago/explante.

A los 3 meses de cultivo, se obtuvieron los primeros brotes en el medio MS5, siendo de mayor tamaño los brotes obtenidos en el medio MS2, en un mismo lapso de tiempo. En el medio MS4 se obtuvo un promedio de 1,2 brotes/explante, mientras que en el MS5 el promedio de brotes fue menor (1).

En los cortes anatómicos de hojas con inducción organogénica en medio MS5 incubados en oscuridad, se observó la presencia de un meristemoide en el mesófilo de la hoja (Fig.23 A) meristemoide en callo (Fig. 23B) y la formación seguida de una yema (23C).

Después de 3 meses que los nuevos brotes se separaron del explante y se cultivaron en el medio MS, el crecimiento fue lento, no crecieron más de 2,5 cm, estos se transfirieron a medio de enraizamiento (Fig.25).



Fig. 22 Corte transversal de hoja (4x) observándose (A) un meristemoide formándose desde células de callo (B) y C) una yema formada directamente del tejido, en medio MS5.



Fig.23- Corte transversal de hoja (10X) A) Detalle del meristemoide inmerso en el mesófilo. B) meristemoide inmerso en el callo C) Yema.



Fig. 24 Corte transversal de hoja, donde se observa el desarrollo de un brote a partir del nervio central.

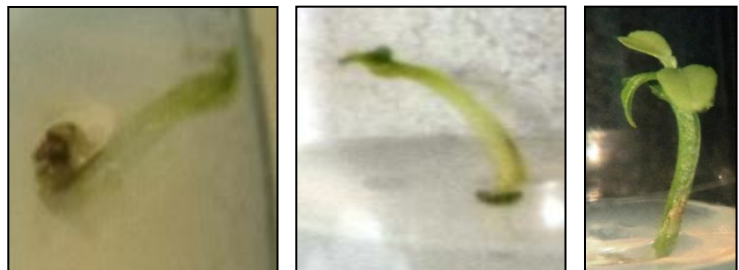


Fig. 25 Desarrollo de una plántula obtenida a partir de la organogénesis de hoja en MS5 incubados en la oscuridad. A) A los 90 días de cultivo en MS5, oscuridad. B) Nuevo brote transferido a medio MS. C) Plántula obtenida después de 60 días en medio MS.

5.4 Aclimatización

Del total de los 3 microesquejes enraizados que fueron transferidas a tierra y mantenidos en los propagadores, se obtuvo que 2 sobrevivieron al final de los 5 meses que duró el período de aclimatización (Fig.24).



Fig. 24 A. Segmentos de microesquejes enraizados *in vitro* y luego llevados a tierra. B) Aclimatización en un periodo de ocho semanas.

Del total de las plantas germinadas *in vitro* (10) que fueron transferidas a tierra y mantenidas en los propagadores, se obtuvo que 100 % sobrevivió al final de los dos meses que duró el período de aclimatización (Fig.25)



Fig.25 Plántulas germinadas *in vitro* llevadas a tierra, en una primera etapa en cámaras de aclimatización.

6. DISCUSSION

6.1 Germinación de semillas de *Citrus reticulata*

Haciendo un análisis comparativo entre las semillas con y sin cubierta seminal cultivadas *in vitro*, se apreció que las semillas sin cubierta germinaron en un 85%, mientras que las semillas con cubierta no germinaron, esto sugiere que la cubierta seminal representa de alguna manera una barrera física en la germinación *in vitro* de semillas de *C. reticulata*. Soto (2003), Martínez y col. (2006), Savita y col. (2011) en sus investigaciones con cítricos germinaron *in vitro* semillas desprovistas de los tegumentos seminales.

En este trabajo de investigación se obtuvo un promedio de 1,99 plantas/semilla es decir, que se obtuvo más de una planta por cada semilla. Chaundry en 1994 y Shwakat en el 2006, trabajando con germinación *in vitro* de Citrus, encontraron 75 y 85 % respectivamente de semillas germinadas, y la mayoría de las semillas produjeron más de una planta por semilla, lo que se debe a que la poliembrionía, muy común en Cítricos.

En las plantas poliembriónicas o apomícticas, los embriones se forman a partir de la nucela y del cigoto. Esta característica puede permitir clonar cultivares y portainjertos, a través de semilla, ya que los embriones de origen nucelar reproducen las características de la planta madre. Desde el punto de vista evolutivo, las plantas apomícticas carecen de las ventajas adaptativas que ofrece la reproducción sexual, es decir las condiciones ambientales afectan la poliembrionía del mandarino, ya que son las plántulas de origen cigótico las que sobreviven sobre las demás plantas de origen nucelar. Es aquí donde el cultivo *in vitro* cumple un papel de gran importancia, ya que en este sistema generalmente el promedio de

plantas por semillas puede ser mayor que en tierra. Resultados similares obtuvieron Rodríguez y col. en el 2000, donde del 60 % de las semillas de mandarina cultivadas *in vitro* sobrevivían entre 2 a 4 plantas por semillas, mientras que *in vivo* germinaron un 30 %, con un promedio de 2 plantas por semilla.

Cabe resaltar que las semillas de Citrus, tienen muy corto periodo de viabilidad el cual decrece al incrementar el tiempo de almacenamiento (Johnston 1968, citado por Savita y col. 2011).

6.2 Multiplicación u organogénesis de *C. reticulata* a partir de microesquejes

En el medio control sin reguladores (MS1), los microesquejes continuaron su desarrollo, sin observarse la formación de callo u otra estructura de novo.

El cultivo de microesquejes en medio MS2 suplementado con BA+GA, resulto satisfactorio para la multiplicación de *Citrus reticulata*, con un promedio de 7,03 brotes/explante. Pérez y col. en el 2010, trabajando con segmentos nodales de *C. limón* encontraron resultados similares en cultivo *in vitro*, 8 brotes/explante. Según Pérez (2010), los explantes micropropagados pueden ser usados como un recurso ideal para obtener material aséptico y homogéneo para los diferentes experimentos de transformación o mutagénesis, y los protocolos de micropagación descritos en este estudio pueden ser fácilmente aplicados para la efectiva propagación de plantas genéticamente modificadas.

El promedio de brotes/explante obtenidos en el medio MS3 suplementado con BA+ANA, fue de 3,2, (aunque las hojas de estos brotes eran de mayor tamaño que las de los brotes formados en MS2), observándose una disminución en el promedio de multiplicación

con respecto al medio con BA+GA3. Esto sugiere, que el uso de ANA + BA no fue la combinación hormonal mas adecuada para la multiplicación de los brotes de *C. reticulata* en comparación con la combinación de BA +GA3. Mientras que Almeida y col. (2003), encontraron trabajando con microesquejes de *Citrus sinensis* en medio DBA3 suplementados con BA (1mg/L)+ANA (0,5 mg/L) incubados en oscuridad obtuvieron la mayor respuesta para la inducción de yemas adventicias todos los cultivares estudiados. .

El BA (6- Benciladenina), a varias concentraciones, ha sido el regulador de crecimiento de plantas mas comúnmente utilizado para la proliferación de vástagos de Citrus (Carimi y De Pasquale 2003, citado por Pérez). En su estudio, cuando se empleaba BA solo, la proliferación fue más baja y los vástagos fueron cortos con largas hojas. Al combinarlo con GA3 se promovió la multiplicación y la elongación de vástagos adventicios.

Algunas veces, en el estado de proliferación, GA puede mejorar el crecimiento y/o incrementar el radio de proliferación de vástagos (Moshkov y col., 2008, citado por Pérez, 2010), de manera que la adición de GA con BA causo la mas alta frecuencia de regeneración de yemas y multiplicación de vástagos en las yemas apicales de los brotes y microesquejes de *Morus cathyana* (Pattnaik y Chand 1997y Kotsias y Roussos 2001, citado por Pérez).

6.3 Organogénesis de *C. reticulata* a partir de segmentos de entrenudos

Los segmentos de entrenudos de *C. reticulata* cultivados en el medio control sin reguladores (MS1) no indujo la formación de callo y/o brotes. Esto sugiere que para lograr la inducción de la respuesta organogénica fue necesario aplicar el estímulo hormonal al

explante que modificara el balance hormonal endógeno de los mismos, ya que el existente no era adecuado por si solo para generar la formación de callo en ninguna de los explantes.

Los segmentos de entrenudos cultivados en medio MS5 suplementados con BA+K+ANA e incubados en la oscuridad, generó una respuesta satisfactoria en la inducción para la organogénesis con un promedio de 1,6 brotes/explante por vía directa (sin la formación previa de callo) y por vía organogénesis indirecta (con la formación previa de callo), se infiere que en los tejidos empleados como explantes se encontraban células predeterminadas para el proceso de organogénesis. En los segmentos de entrenudos cultivados en medios MS4 (1 mg/L BA) e incubados en oscuridad no se logro la inducción para la organogénesis.

Germana y col. en el 2011, trabajando con entrenudos de *Carrizo citrange* en medios suplementados con 1 mg/L de BA incubados en luz obtuvieron un promedio de 1,4 brotes/explante Normah y col. en 1997, cultivaron entrenudos en medio MS suplementado con concentraciones entre 0,5-2,5 mg/L de BA incubados en luz obtuvieron el máximo número de vástagos. Moreira y col. 2000 trabajando con entrenudos de Troyer Citrange cultivados en medio MS suplementado con 1mg/l, encontraron que la mejor respuesta para la organogénesis fue en luz.

Al utilizar la citocinina en combinación con la auxina, se observo que además de brotes había formación de callo, podríamos pensar que la relación de concentraciones de estas sustancias de crecimiento no fue la mas adecuada en la estimulación de una respuesta organogénica, la cual en parte favorecía, mas bien, el cambio de la ruta metabólica hacia la formación de tejido indiferenciado. Suponiendo que los niveles endógenos de auxinas son altos, es lógico pensar que no se esta favoreciendo la condición caulogénica.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células, ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes y raíces dependiendo fundamentalmente del balance auxina/citoquinina del medio de cultivo (Gómez, 1998).

6.4 Organogénesis de *C. reticulata* a partir de segmentos de segmentos de hojas

Los segmentos de hojas de *C. reticulata* cultivados en el medio control sin reguladores (MS1) no indujo la formación de callo y/o brotes. Esto sugiere que para lograr la inducción de la respuesta organogénica fue necesario aplicar el estímulo hormonal al explante que modificara el balance hormonal endógeno de los mismos, ya que el existente no era adecuado por si solo para generar la formación de callo ni brotes en ninguno de los explantes.

Con los segmentos de hojas cultivados en medio MS4 (2 mg/L BA) e incubados en luz se obtuvo un 17% de respuesta (1,2 brotes/explante) y 3% (1 brote/explante) en medio MS5 (0,5BA+0,5K+0,1ANA). En el medio MS4 suplementados con BA incubados en la oscuridad, no respondieron en el tiempo de experimentación.

Los explantes de hojas respondieron exitosamente en ambos medios utilizando diferentes condiciones de incubación. Al comparar los resultados evaluando medio y condición de incubación se determinó que la mejor respuesta de regeneración en cuanto a la cantidad de vástagos producidos fue en medio MS5 (0,5 BA+0,5 K+0,1ANA) en oscuridad y en MS4 (2 mg/L BA) incubados en luz.

Khan y col. en el 2009, trabajando con segmentos de hojas de *Citrus sinensis* (Dos cultivares: BTC y Val) encontraron resultados con un promedio 4,29 brote/explante para el cultivar BTC y 3,16 cultivar Val. Obtuvieron la organogénesis en ambas condiciones de incubación, siendo mucho mayor en oscuridad que en luz. El proceso fue directo, sin previa formación de callo. Este punto es de gran importancia porque las plantas producidas por organogénesis directa pueden tener una gran estabilidad genética que los producidos a partir de callos (Lee y Phillips, 1998; Karam y Al-Majathoub, 2000, citados por Khan y col.en el 2009).

Con respecto al papel que desempeñan las sustancias reguladores de crecimiento, se encontró que estas constituyen un factor crítico para la inducción de organogénesis en cultivos de tejidos vegetales, se encontró que el efecto de las mismas (medido en base numero de explantes con brotes desarrollados) variaba de acuerdo a la sustancia adicionada según el siguiente orden: sin sustancia de crecimiento, BA y BA+K+ ANA. Con BA solo se obtuvo respuesta al incubar los explantes en luz, mientras que en los medio suplementados con las tres hormonas se obtuvo mayor numero de brotes/explante al incubar los explantes tanto en oscuridad como en luz.

La importancia de la citoquinina para la organogénesis se ha estudiado en muchas especies de plantas (Pereira y col., 2000; Guo y col., 2005; Zhang y col., 2008, citados por Khan y col.en el 2009), considerando como un elemento exclusivo para la formación de vástagos y que la concentración de citocininas exógenas requeridas por los explantes dependerá siempre de la especie, cultivar o variedad de rosa que se esté empleando.

Almeida y col., (2003) presentaron datos donde demuestran que la regeneración indirecta vía callos fue detectado bajo oscuridad, mientras bajo fotoperiodo 16h solo inducción de yemas directas a vástagos se llevo a cabo desde microesquejes. En la mayoría de los casos, el cultivo de los explantes en la oscuridad para ciertos periodos pareció ser beneficioso para la regeneración de vástagos, como fue reportado por Almeida y col., (2003), Gu y Zhan (2005) y Espinoza (2006). La exposición a un período oscuro posiblemente puede posiblemente modificar la proporción de hormonas endógenas como citocininas y auxinas, la cual interactúan más razonablemente con la aplicación exógena de reguladores de crecimientos en el medio de cultivo, con fines de promover la regeneración de vástagos (Miguel y col., 1996; Gentile y col., 2002, citado por Almeida y col., (2003).

6.5 Enraizamiento

En lo que se refiere al proceso de rizogénesis, encontramos que para lograr inducir formación de raíces en plántulas provenientes de microesquejes, las cuales se desarrollaban en medio de BA+ANA o BA+ GA₃, era necesario una transferencia previa a un medio sin sustancias de crecimiento, antes de pasarlas al medio de enraizamiento correspondiente, el cual contenía auxina.

Según Pérez 2010, la presencia de una auxina en el medio de cultivo es generalmente necesaria para promover enraizamiento en Citrus. Usualmente, la incubación de vástagos adventicios en ANA (ácido naftalenoacético) o medio suplementados con IBA induce la formación de raíces en varias diferentes especies de Citrus (Carimi y De Pasquale 2003, citado por Pérez y col. 2010).

7. CONCLUSIONES

- Con el uso del medio MS sin reguladores de crecimiento fue posible la germinación *in vitro* del 85% de semillas sin cubierta seminal de *Citrus reticulata*. Con un promedio de 1,99 plantas semilla.
- El mayor promedio (7,03 brotes/explante) de multiplicación *in vitro* a partir de microesquejes de *C. reticulata* se obtuvo en medio MS2 (2 mg/L BA+ 1 mg/L GA₃)
- Los segmentos de hojas y entrenudos de *C. reticulata* cultivados *in vitro*, solo respondieron en los medios donde se habían adicionado reguladores de crecimiento.
- El tratamiento de reguladores de crecimiento más eficiente para la inducción de la organogénesis a partir de segmentos de entrenudos (1,6 brotes/explante) y de hojas (2,5 brotes/explante) fue 0,5 mg/L de BA, 0,5 mg/L de K y 0,1 mg/L de ANA.
- La mayor respuesta en luz fue cuando se empleo el medio MS4 (17% con un promedio de 1,2 brotes/explante), mientras que la mayor respuesta en

oscuridad se encontró cuando se empleo el medio MS5 (27% con un promedio de 2,5 brotes/explante).

- Los análisis estadísticos demostraron que existen diferencias significativas entre las respuestas morfogénicas de los 3 explantes estudiados. Siendo microesquejes el mejor con respecto a hoja y entrenudos.
- Los análisis estadísticos demostraron que existen diferencias significativas entre las respuestas morfogénicas en los medios utilizados.
- Evidencias histológicas demostraron la ocurrencia de organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos de entrenudo y de hojas.
- Este trabajo es una contribución a la reactivación de la investigación en Venezuela sobre micropropagación y organogénesis *in vitro* de los cítricos.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Agustí, M. (2003) Citricultura. Ed. Mundi-prensa, Madrid, España.
2. Agramonte, D., Jiménez, F y Dita, M.1998. Aclimatización. En: J.N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba, 193-206 pp.
3. Al-Bahrany, A. 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Sci hortic-amsterdam* **95**: 285-295.
4. Al-Khayri, J. y Al-Bahrany, A. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *CURR SCI INDIA* **81**: 1242-1246.
5. Almeida, W.A.B., Mourao Filho, F., Mendes, B. M. J. y Rodríguez, A. P. M. 2002. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Sci Agricola*. **59**: 35-40.
6. Almeida, W.A.B., Mourao Filho, F., Pino, L. E., Boscariol, R. L., Rodríguez, A. P. M. y Mendes, B. M. J. 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Elsevier*. **164**: 203-211.
7. Almeida, W.A.B., Mourao Filho, F., Mendes, B. M. J.Y Rodríguez, A. P. M. 2006. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. *Biol Plantarum*. **50(3)**: 321-325.
8. Aular, J. 2006a. Consideraciones sobre el manejo postcosecha de frutas en Venezuela. In. Aular, J. Memoria de Jornada sobre manejo postcosecha de frutas. UCLA- Postgrado de Horticultura. pp. 5-13.

9. Aular, J. 2006b. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela In. Aular, J. Memoria del IX Congreso Venezolano de Fruticultura. pp. 5-9.
10. Aular, J. y J. Aular-Rodríguez. 2007. Calidad de la naranja proveniente de Yumare, Venezuela, y su evolución en el período de zafra. *Bioagro* **19(3)**: 169-174.
11. Bruno, Y. 2011. Cítricos: situación y perspectivas. Anuario 2011 – OPYPA.
12. Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por Cultivo *In vitro*: Una Biotecnología que nos Acompaña Hace Mucho Tiempo.
13. Chaundry, M. I., 1994: Fruit Crops. In: Malik M.N. (ed.), *Horticulture*, 422. National. Book Foundation, Islamabad.
14. Arancibia, A. 2008. Desarrollo de plantas de cítricos tolerantes a salinidad y otro estrés mediante transformación genética. PROYECTO INNOVA-CHILE – FDF.
15. Christiason, M. y Warnick, A.1983. Competence and Determination in the Process of *in vitro* Shoot Organogenesis. *Environmental Biology*. **95**: 228-293.
16. Fermín, V., y De Vélez G., .1990. Plantas alimenticias de Venezuela. Fundación Bigott, Primera edición, Caracas, Venezuela.
17. Germana, M., Micheli M., Chiancome B., Macaluso L. y Standardi A., 2011. Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. *Plant cell tiss org*.**106**: 299-307.
18. Gómez, R. 1998. Embriogénesis somática. En: J.N. Pérez Ponce (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas, Cuba. 57-59 pp.
19. Hassanein, A. y Azooz, M. 2003. Propagation of *Citrus reticulata* via *in vitro* seed germination and shoot cuttings. *Biol Plantarum*. **47(2)**: 173-177.

20. Hicks, G. 1994. Shoot Induction and Organogenesis *in vitro*: A Developmental Perspective. Review. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **30**: 10-15.
21. Huang, T., Peng, SL., Dong, GF. Zang, LY. y Li, GG. Plant regeneration from leaf-derived callus *in Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. *Plant cell tiss org.* **69**: 141-146.
22. Hurtado, D. y Merino, M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, S.A. de C. V. México D.F., México. 49-81, 154-158 pp.
23. Instituto Nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria. Venezuela, 2012.
24. Jiménez, E. 1998. Generalidades del Cultivo *In Vitro*. En: J. N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13- 24 pp.
25. Khan, E., Fu, X., Wang, J., Fan, Q., Huang, X., Zhang, G., Shi, J. y Liu, J. 2009. Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. *Sci hortic-amsterdam*. **120**: 70-76.
26. Krikorian, A. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. y Mroginski, L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia. 95-125 pp.
27. Litz, R. y Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. En: Roca, W. y Mroginski, L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia. 143-172 pp.

28. Martínez, J. 1988. Aplicaciones del cultivo de tejidos en la propagación y el mejoramiento de los cítricos.
29. Martínez, M., López, a., Osorio, f., Gallardo, f., López, h. y Mata, M. 2006. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *CURR SCI INDIA* **31**: 616-619.
30. Martínez, O. 2009. Dulce y Divertida es la Mandarina. Ed. Informativo del Abasto. Año 6, No. 80 p.7 Noviembre, 2009.
31. Menéndez, A., Oropeza, M., y Vargas, T.E. 2003. Guía de prácticas de cultivo de tejidos vegetales. Universidad Central de Venezuela. Facultad de ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Botánica, pp. 45.
32. Mercier, H., Souza, B., Kraus, J., Hamasaki, R. y Sotta, B. 2003. Endogenous Auxin and Cytokinin Contents Associated with Shoot Formation in Leaves of Pineapple Cultured *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.*, **15**:107-112.
33. Moreira, J., Molina, R., Bordon, Y., Guardiola, J. y García-Luis, A. 2000. Direct and Indirect Shoot Organogenic Pathways in Epicotyl Cuttings of Troyer Citrange Differ in Hormone Requirements and in their Response to light. *Ann Bot* **85**: 103-110.
34. Moore, G. (2001) Orange and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics* 17 (9): 536-540.
35. Muhammad, U., Sana, M. y Fátima, B. 2005. *In vitro* multiple shoot induction from nodal explants of *citrus* cultivars. *CENT EUR AGRIC.* **4**: 435-442.
36. Mukhtar, R., Khan, M., Fátima, B., Abbas, M. y Shahid, A. 2005. *In vitro* Regeneration and Multiple Shoots Induction in Citrus reticulata (Blanco).

37. Nafees A., Abdul R., Lianqat A. y Inkisar A. 2009. *In vitro* culture of kinnow explantes. Pak. J. Bot., 41(2): 597-602.
38. Normah, M., Hamidah, S. y Ghani, F. 1997. Micropropagation of *Citrus halimii*- an endangered species of south-east Asia. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **50**: 225-227.
39. Orellana, P. 1998. Propagación vía Organogénesis. En: J.N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba. 151-178 pp.
40. Pérez, T., Tallón, C. y Porras, I., 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limón*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **100**: 263-271.
41. Pierick, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 181-224 pp.
42. Rodríguez
43. Savita, Singh, B., Virk, G. y Kaur A. 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. *Physiol Mol Biol Plants*.
44. Shawkat, A. y Mirza, B. 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Bot. Croat.* **65 (2)**: 137-146.
45. Singh, S., Ray, B., Bhattacharyya, S y Deja P. 1994. *In Vitro* Propagation of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm.f. *Sci hortic-amsterdam.* **29 (3)**: 214-216.
46. Singh, I., Parthasarathy, V. y Handique, P. 2003. Comparative growth of micropropagated plantlets and seedlings of citrus varieties. *Agrotrópica.* **15(1)**: 9-16.

47. Soto, S. 2003. Evaluación de diversos parámetros que afectan el prendimiento de ápices caulinares de cítricos injertados *in vitro*. Revista del instituto nacional de innovación y transferencia en tecnología agropecuaria. Año 1. Numero 1. 4-12 pp.
48. Villalobos, V. 1990. Organogénesis. En Rosell, C. y Villalobos, V. (ed.). Fundamentos teóricos- prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal. **105**: 29-32.
49. Yang, L., Xu, C., Hu, G. y Chen S. 2006. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in *Fortunella crassifolia*. Biol Plantarum. **50(4)**:729-732.
50. Zeng, L., Xu, H., Zeng, Y., Aiye, L. y Huiquang W.W. 2009. High efficiency in vitro plant regeneration from epicotyls explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). In Vitro Cell Dev. Biol-Plant. **45**: 559-564.

Consultas en línea:

- ✓ Agroforum. Perspectivas países exportadores de mandarinas. [En línea]. 2011.
Available from:
URL: <http://www.agroforum.pe/showthread.php?1152-Perspectivas-de-los-pa%EDses-exportadores-de-mandarina>
- ✓ FAO. 2008. [En línea]. 2011. Available from:
URL: <http://faostat.fao.org>
- ✓ Noticias. Toda frutas. [En línea]. 2011. Available from:
URL: <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=19531>
- ✓ SAGARPA. **De pulpa suave, dulce y refrescante, fácil de pelar y apreciada por todas las edades.** [En línea]. 2011. Available from:
URL: <http://faostat.fao.org> <http://www.siap.gob.mx/>

- ✓ Universidad Nacional de Valencia. Tema 20: Familia Rutáceas [En línea]. 2011.

Available from:

URL:<http://www.euita.upv.es/vari0s/biologia/Temas%20Angiospermas/R%C3%B3sidas/Rut%C3%A1ceas/Rut%C3%A1ceas.htm>

NO COPIAR