

28a
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
ZARAGOZA

Respuesta de dos Patrones de
Cítricos (*Citrus spp.*), a la Técnica
de Microinjerto y a condiciones
de confinamiento *IN VITRO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

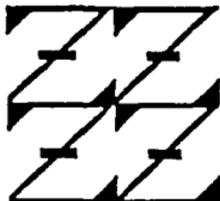
B I O L O G O

P R E S E N T A :

Arnulfo Mendoza Pineda

SEPTIEMBRE 1994

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**RESPUESTA DE DOS PATRONES DE CITRICOS (*Citrus spp.*), A LA
TECNICA DE MICROINJERTO Y A CONDICIONES DE CON-
FINAMIENTO *IN VITRO*.**

A la memoria de Sarita

DEDICATORIAS

A mi hijo Arno Abner:

Cuya incesante presencia me motiva a superarme

A mi madre Doña Irene y a mi esposa Mimi:

Engendradoras de lo que más estimo, y a las cuales no por eso menos aprecio

A la verdadera amistad:

Preciado don, que si lo poseyera en cantidad a mis huellas dactilares, mas afortunado no podría ser Rockefeller.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por haberme brindado la oportunidad de superarme.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, a través del Campo Agrícola Experimental Zacatepec, por permitirme realizar en sus instalaciones este trabajo de tesis.

Mi mas sincero agradecimiento al M. en C. Ricardo Méndez Salas, por su valiosa dirección y orientación prestada durante el presenta trabajo, y por la inapreciable amistad que conservo.

Al M. en C. Amadeo Barba Alvarez, por su excelente disponibilidad y labor crítica en las observaciones y comentarios en la lectura y revisión de ésta tesis.

A la Bióloga Patricia López González, por la gran ayuda y orientación prestada en el quehacer de laboratorio requerido para éste trabajo.

Al Sr. Francisco Arpide Flores, por su estimable cooperación en el tratamiento informático de éste escrito.

A la familia Balboa Domínguez por su gentil ayuda en el procesamiento informático del texto de esta tesis.

A los Srs. Fructuoso Jaramillo y Luis Ocampo, por su apreciable ayuda en laboratorio e invernadero.

A todas las personas que de una forma u otra hicieron posible la realización de éste trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	5
2.1 Ubicación taxonómica de los cítricos	5
2.2 Problemática de su cultivo	6
2.2.1 Enfermedades virosas	6
2.2.2 Enfermedades virosas en México	7
2.3 Metodologías de saneamiento vegetal	7
2.3.1 Quimioterapia	8
2.3.2 Termoterapia	9
2.3.3 Embriones nucelares	9
2.3.4 Microinjerto <i>in vitro</i>	9
2.3.5 Estudios en México	10
2.4 Conservación de germoplasma	11
2.5 Justificación	12
2.6 Hipótesis	12
2.7 Objetivos	13
III MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Material biológico	14
3.1.1 Obtención de patrones	15
3.1.2 Medio de germinación aséptica de semillas	15
3.1.3 Obtención de los ápices	16
3.1.4 Sustrato de mantenimiento de varetas	16
3.2 Descripción de la técnica de microinjerto	16
3.2.1 Preparación del portainjerto	16
3.2.2 Preparación de la yema	17
3.2.3 Establecimiento del microinjerto	17
3.2.4 Medio de mantenimiento de plantas microin- jertadas	17
3.2.5 Mantenimiento de germoplasma	18
3.2.6 Incubación	18
3.2.7 Observaciones	19
3.4 Trasplante a suelo	20
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 Obtención de los portainjertos	21

4.1.1	Características asociadas a los portainjer- tos	21
4.2	Variedades utilizadas como injertos	22
4.2.1	Respuesta de la fuente de yemas	22
4.2.2	Características de los ápices generados in vitro	24
4.3	Características de los microinjertos	24
4.3.1	Análisis estadístico	26
4.4	Comportamiento a largo plazo	29
V	CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	31
	BIBLIOGRAFÍA	32
	APÉNDICE	40

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO I	DISTRIBUCIÓN DE CULTIVOS DE CÍTRICOS EN MÉXICO	1
CUADRO II	UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS CÍTRICOS	5
CUADRO III	SUSTANCIAS QUIMIOTERAPÉUTICAS DE MAYOR APLICACIÓN	8
CUADRO IV	DESCRIPCIÓN VARIETAL DE MICROINJERTOS <i>IN VITRO</i>	18
CUADRO V	CONSTITUYENTES DE LOS MEDIOS UTILIZADOS	20
CUADRO VI	TALLA PROMEDIO EN mm Y NÚMERO DE HOJAS EN PATRONES ETIOLADOS Y GENERADOS BAJO FOTOPERÍODO	22
CUADRO VII	VARETAS VIABLES DESPUÉS DE 23 MESES DE CONFINAMIENTO.	22
CUADRO VIII	VARETAS VIABLES DESPUÉS DE 29 MESES DE CONFINAMIENTO.	22
CUADRO IX	LOCALIZACIÓN DE TALLOS ADVENTICIOS GENERADOS POR EL NARANJO AGRIO Y EL NARANJO DULCE	25
CUADRO X	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LOS MERISTEMOS DENTRO DEL CORTEZ DE "T" INVERTIDA.	26
CUADRO XI	PORCENTAJE DE PLANTAS GENERADORAS DE TALLOS ADVENTICIOS	26
CUADRO XII	TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA, EN ARREGLO FACTORIAL DE 2 FACTORES, EN UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR.	27
CUADRO XIII	ORDEN ARREGLADO DE LA PRUEBA DE DUNCAN DE LOS DATOS DE SOBREVIVENCIA DE LOS MERISTEMOS INJERTADOS.	27
CUADRO XIV	PORCENTAJE DE MICROINJERTOS PRENDIDOS SOBRE NARANJO DULCE Y NARANJO AGRIO.	29
CUADRO XV	COMPARACIÓN DE LA DISTANCIA INTERNODAL DE TALLOS ADVENTICIOS, A 21 DÍAS Y A 18 MESES	30
FIGURA 1	SUPERFICIE CULTIVADA DE CÍTRICOS EN MÉXICO	1
FIGURA 2	PRODUCCIÓN CITRÍCOLA MUNDIAL	2
FIGURA 3	PRINCIPALES FASES DEL ESTABLECIMIENTO DEL MICROINJERTO	19
FIGURA 4	PATRONES DE NARANJO AGRIO DE DOS SEMANAS DE EDAD. IQ. ETIOLADO. DER. GERMINADO BAJO RÉGIMEN NORMAL DE ILUMINACIÓN	21
FIGURA 5	VARETA DE NARANJA VALENCIA DE 21 MESES DE CONFINAMIENTO MOSTRANDO BROTE JOVEN, SOBRE CICATRIZ DE RENUEVOS ANTERIORES	23
FIGURA 6	VARETA DE TORONJA REDBLUSH DE 21 MESES DE CONFINAMIENTO CON YEMAS ADVENTICIAS EN LA CICATRIZ DE RENUEVOS ANTERIORES	23
FIGURA 7	ÁPICE CAULINAR DE LIMÓN REAL MOSTRANDO UN MERISTEMO CON TRES PRIMORDIOS FOLIARES	24

FIGURA 8	MERISTEMO CON 5 PRIMORDIOS FOLIARES, DENTRO DEL CORTE DE "T" INVERTIDA PRACTICADO A UN PATRÓN DULCE	25
FIGURA 9	REPRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS EN UN PATRÓN CON CORTE DE "T" INVERTIDA	25
FIGURA 10	VIABILIDAD DEL MICROINJERTO PARA LAS DIFERENTES VARIEDADES INJERTADAS	28
FIGURA 11	TALLO ADVENTICIO DE NARANJO DULCE IN VITRO DESPUÉS DE 4 MESES DE CONFINAMIENTO	30
FIGURA 12	TALLO ADVENTICIO DE NARANJO DULCE DESPUÉS DE 10 MESES DE CONFINAMIENTO, SIN FOLLAJE Y CON LA DISTANCIA INTERNODAL REDUCIDA	30

RESUMEN

Mediante éste trabajo se determinó la respuesta del naranjo dulce y el naranjo agrio, como patrones a la técnica de microinjerto *in vitro* implementada por Navarro et al. (1975). Ensayadas con variedades comerciales de Naranja dulce (*Citrus sinensis*), Toronja (*C. paradisi*), Mandarina (*C. reticulata*), Tangelo (*C. reticulata* X *C. paradisi*) y Citrange (*Poncirus trifoliata* X *C. sinensis*) y dos especies locales, "Limón real" (*C. limettioides*) y Limón mexicano (*C. aurantifolia*).

El material vegetativo para injertar fue sometido a condiciones de confinamiento *in vitro*, mediante su instalación en solución acuosa de benlate a 1 g/l, en condiciones no asépticas, como fuente de ápices para el ensayo de los patrones y se determinó su viabilidad en las mismas condiciones, hasta un período de 29 meses sin que cesara la producción de brotes aptos para el microinjerto.

El material resultante de la técnica de microinjerto fue conservado en el mismo medio de mantenimiento de microinjertos hasta un período de 18 meses, sin pérdida de viabilidad y con una supervivencia del 80% del material trasplantado a sustrato sólido.

I INTRODUCCIÓN

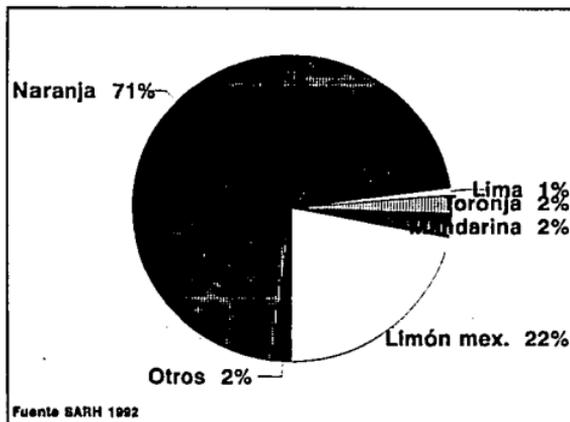


Fig. 1 Superficie cultivada de cítricos en México

La citricultura nacional cuenta actualmente con una superficie total de 373 351 Ha. cultivadas, de las cuales un 71.2% corresponden a naranja dulce (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) y un 22% aproximadamente a limón mexicano (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) (Figura 1), la distribución por especies de la superficie

cultivada de cítricos se muestra en el cuadro siguiente:

CUADRO I DISTRIBUCIÓN DE CULTIVOS DE CÍTRICOS EN MÉXICO

CULTIVO	SUPERFICIE CULTIVADA (Ha)
Lima	2 226
Limón mexicano	82 221
Mandarina	9 207
Naranja	265 840
Toronja	7 521
Otros	6 336

Fuente, SARH (1992).

La producción de 1991 alcanzó un total de 4 710 345 toneladas que significaron alrededor de un billón 614 mil 23 millones de pesos, (SARH, 1992), lo cual refleja una importancia económica y social considerable. Esto lo ha colocado entre los primeros países productores de cítricos a nivel mundial (Figura 2) (Agustí y Almela, 1991)

La producción de cítricos se encuentra amenazada por diversos factores, entre los que destacan las plagas y enfermedades.

Las principales plagas que afectan a los cítricos son las escamas, los pulgones, lepidópteros, ácaros y dípteros (Mc Gregor y Gutiérrez, 1983; González, 1984;

Gutiérrez, 1985), pero el más grave factor que los afecta es el de las enfermedades, y entre éstas las causadas por virus y micoplasmas, esto debido a que no existen tratamientos prácticos para curar plantas infectadas.

Las plantaciones de cítricos del país muestran que existe un deterioro notable causado por virosis (Báez y Berdeja, 1981; Rodríguez, 1981; Ramírez, 1982), causando un detrimento de la población.

El problema más grave de virosis lo constituye la enfermedad conocida como la "Tristeza de los cítricos", que ha mostrado ser muy virulenta, principalmente en la combinación de injerto naranjo dulce / naranjo agrio (*C. aurantium* L.) y con el limón mexicano, los cuales representan el 93.2% del total de cítricos cultivados, además la tristeza es transmisible por insectos chupadores y mecánicamente por las herramientas usadas para el injerto y la poda (Fawcett y Wallace, 1946; Meneghini, 1946; Cockran, 1959; Esau, 1961).

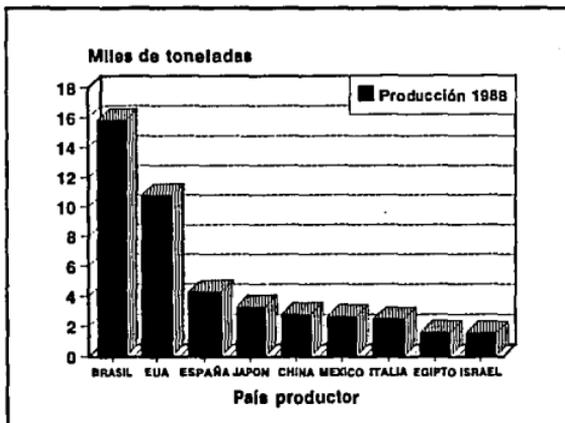


Fig. 2 Producción cítricola mundial

La estrategia de saneamiento vegetal en plantaciones con problemas de virosis consiste en la obtención y distribución de material de propagación libre de virus, para disminuir la proporción de plantas infectadas y su reemplazo a medida que ocurra un deterioro significativo de la población (Hollings, 1965).

Para obtener el material libre de virus se han ensayado métodos con diversos grados de éxito, éstos involucran técnicas de tratamiento con calor o termoterapia, la quimioterapia, la obtención de plantas a partir de embriones nucelares, y el microinjerto *in vitro*.

Los resultados obtenidos con la termoterapia y la obtención de plantas a partir de embriones nucelares no fueron totalmente satisfactorios, ya que, en el caso de la termoterapia al cesar el tratamiento el patógeno recupera su agresividad y en la obtención de plantas a partir de embriones nucelares se presenta el problema de juvenilidad, cuyas características como espinas grandes y abundantes, baja producción en los primeros años, baja calidad de fruto, etc. hacen poco práctico su uso.

La técnica de microinjerto *in vitro* desarrollada inicialmente por Murashige *et al.* (1972) y modificada por Navarro *et al.* en 1975 (Navarro, 1975; 1979) ha probado ser un magnífico método de obtención de material vegetativo libre de virus, debido a su alta eficacia y a que no presenta inconvenientes como los que limitan a las técnicas anteriores.

El microinjerto *in vitro* consiste básicamente en la implantación de un meristemo o ápice caulinar con 2 ó 3 primordios foliares sobre un patrón obtenido de una semilla y mantenido en un medio nutritivo artificial, todo bajo condiciones asépticas.

La obtención de material vegetativo de cítricos libre de virus implica la conveniencia de mantener una fuente de yemas sanas, lo cual resulta riesgoso cuando se usan sistemas convencionales de confinamiento por medio de mallas antipulgón, ya que existe el riesgo de una eventual introducción de insectos que pueden ser vectores de una nueva infección, debido a esto el uso de sistemas que permitan la conservación de germoplasma *in vitro* ha cobrado gran importancia.

Los trabajos sobre microinjerto *in vitro* han sido realizados usando como patrón al citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* (L) Raft. X *C. sinensis* (L) Osbeck) principalmente, y otros tales como el limón rugoso (*C. jambhiri* Lush), cidro (*C. medica* L) y *C. macrophylla* West, en menor escala (Navarro *et al.*, 1975; Roistacher y Kitto, 1977; Tusa *et al.*, 1978; Azaola 1979; Cedano, 1981). Estos patrones son poco usuales localmente, lo que dificulta su adquisición y eleva los costos en un programa donde se contemple la sustitución de poblaciones, debido a esto sería de gran utilidad la disponibilidad de patrones de genotipos establecidos en México, que

además se encuentren adaptados a las condiciones climáticas y edáficas locales.

Es necesario además, establecer las condiciones físicas y químicas apropiadas para mantener un germoplasma de cítricos sano, garantizando una fuente de yemas cuando así se requiera. De esta forma, el mantenimiento *in vitro* garantizaría un control absoluto de las posibles fuentes de infección en un espacio mas reducido al que se necesita en campo o invernadero.

II ANTECEDENTES

2.1 Ubicación taxonómica de los cítricos

Las principales especies de cítricos de importancia hortícola se agrupan bajo los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*, que están incluidos entre los 33 géneros pertenecientes a la subfamilia Aurantioidea, la cual está ubicada según se describe en el siguiente cuadro:

CUADRO II UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS CÍTRICOS

DIVISIÓN	Traqueofitas
SUBDIVISIÓN	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
SUBCLASE	Arquiclamídeas
ORDEN	Geraniales
SUBORDEN	Geraniíneas
FAMILIA	Rutáceas

según Morín (1985).

La mayoría de los cítricos cultivados y sus parientes silvestres son nativos del Asia oriental, en una zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya, hasta la China meridional, Indonesia, Tailandia, Malasia e Indonesia, y su hábitat natural abarca desde el noreste de la India y centro norte de China, hasta Nueva Guinea, noreste de Australia y Nueva Caledonia, y su cultivo se extiende en su mayor parte en las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44° N y 44° S (Agustí y Almela, 1991).

Los cítricos poseen ciertas características, tales como relativa facilidad de hibridación interespecífica e inclusive intergenérica, ocurrencia de poliembrionía y producción espontánea de formas tetraploides, lo cual lleva a la aparición de individuos bastante diferentes a la población progenitora. Esto ha contribuido a la dificultad de su tipificación taxonómica (Morín, 1985), existiendo por lo tanto discrepancias entre los taxónomos.

Merril (1923) estima que todos los cítricos deberían agruparse en una sola especie, sobre la base de su facilidad de hibridación interespecífica, y por otro lado Tanaka (1961) asigna 159 especies solo para el género *Citrus*. Una posición intermedia es la de Swingle (1943), que considera la existencia real de 16 especies dentro del género *Citrus*.

2.2 Problemática de su cultivo

El cultivo de los cítricos es afectado por diversas plagas, entre las que se encuentran querasas, moscas, pulgones, ácaros, nematodos y diversas larvas de lepidópteros. También por enfermedades criptogámicas de origen fungoso, algal, bacteriano y enfermedades de origen viral (Morín, 1985).

Existen tratamientos para resolver los problemas causados por plagas y enfermedades criptogámicas, no así para las enfermedades causadas por virus, las cuales originan altas pérdidas económicas en el mundo al ocasionar baja producción, baja calidad de fruto, pérdida de vigor y longevidad, y muerte de los árboles (Navarro, 1979).

2.2.1 Enfermedades virosas

Dentro de las enfermedades virosas se engloban aquellas causadas por virus, viroides y micoplasmas (Navarro, 1979; Morín, 1985), éstos últimos debido a su comportamiento semejante a los virus. A continuación se describen estos patógenos:

Virus.- Son agentes patogénicos de alto peso molecular, compuestos de proteína (Cápside) y un ácido nucleico, que solo se multiplican en células vivas cuando logran introducirse. Su transmisión puede llevarse a efecto por medio de injerto, insectos vectores (Sharma, 1989), nematodos e incluso por hongos, y en casos raros por semilla (Krantz et al., 1977).

Viroides.- Son ácidos nucleicos de bajo peso molecular que a diferencia de los virus no poseen cápside y son altamente resistentes al calor y a radiación ultravioleta e ionizante. Su transmisión puede tener lugar por medio de polen, semilla, medios mecánicos y posiblemente por insectos (Diener, 1979).

Micoplasmas.- Son organismos procariotas unicelulares que no poseen pared celular, a semejanza de los virus son filtrables solo que más grandes. Su transmisión se efectúa por insectos o por contacto con herramientas de injertar infectadas. Su biología es aún poco conocida (Krantz et al., 1977).

Las principales enfermedades virosas que afectan a los cítricos son las siguientes (Smith, 1972; Navarro, 1979; Morín, 1985; Frison y Taher, 1991):

Tristeza.- Ocasionada por varias razas de virus (Guerri et al., 1990; Moreno et al., 1990), de las cuales se han reportado hasta dieciséis (Guerri et al., 1991) causa encrespamiento del follaje y marchitez, supresión de renuevos, también daños severos en la raíz, pérdida de follaje, finalmente la planta muere de inanición.

Exocortis.- Ocasionada por un viroide, causa arrugamiento de las hojas y lesiones en la corteza de plantas jóvenes, el crecimiento se detiene y la planta declina en su producción conforme la enfermedad avanza.

Grupo Psorosis.- En base a síntomas comunes se ha considerado que seis enfermedades son producidas por virus relacionados, estas son Psorosis A, Psorosis B, Concavidad gomosa, Bolsillos ciegos, Hoja corrugada y Abigarrado infeccioso (Fawcett y Bitancourt, 1943; Wallace, 1957, 1959). De éstas la más extendida y conocida es la Psorosis A (Morín, 1985).

Xiloporosis.- Causada por un viroide, produce impregnaciones gomosas en el floema, acanaladuras en la zona cambial del leño, necrosis en la zona interna de la corteza, presencia de chancros que pueden causar estrangulamiento parcial del tronco, esto ocasiona follaje escaso y clorótico y crecimiento retardado.

Enfermedad pertinaz.- Causada por el micoplasma *Spiroplasma citri*, ataca principalmente a las plantas jóvenes, sus síntomas son enanismo, disminución de la producción, frutos deformes, caída de hojas y declinación progresiva. Todas las variedades comerciales de cítricos son susceptibles a esta enfermedad (Morín 1985).

Existen otras enfermedades menos importantes, tales como hoja rasgada, agalla leñosa, acanaladura de las ramas, etc., que producen daños en los cultivos comerciales de cítricos (Navarro, 1979).

2.2.2 Enfermedades virósicas en México

Las enfermedades virósicas que afectan a los cítricos en México son principalmente Exocortis y Xiloporosis. En Veracruz, primer productor de cítricos se encontró ocurrencia de limón persa (*C. latifolia* Tan.) hasta del 96% y hasta un 20% de Psorosis en naranja valencia tardía (*C. sinensis*) (Báez y Berdeja, 1981).

En Nuevo León, el 56% de árboles de la región de General Terán presentaron Exocortis y el 11% Psorosis (Rodríguez, 1981). En general se estima que el 3% de pérdida anual de árboles del país se debe a Psorosis (Ramírez, 1982).

2.3 Metodologías de saneamiento vegetal

Un procedimiento eficaz para obtener material vegetativo con características sobresalientes es el método de protección cruzada (Cross protection). este método consiste en la selección de plantas infectadas con complejos virósicos que presentan una patogenicidad atenuada y que permite que estas plantas mantengan alta producción, gran calidad de fruto y una presencia mínima de síntomas de la enfermedad. La presencia de tales complejos "suaves" interfiere

impidiendo la acción de otros complejos de patogenicidad más agresiva.

Las plantas seleccionadas son de alta rentabilidad y no manifiestan declinación. Este método ha sido ensayado satisfactoriamente con material sensible a tristeza (Costa y Muller, 1980; Morin, 1985; Van Vuuren et al. 1993).

Para la obtención de material de cítricos libre de virus se han usado cuatro técnicas; la quimioterapia, la termoterapia, la obtención de plantas a partir de embriones nucleares y la obtención de material vegetativo libre de virus por microinjerto *in vitro* de ápices caulinares.

2.3.1 Quimioterapia

Está basada en la aplicación de sustancias químicas específicas a plantas o tejidos infectados para alterar su metabolismo, y de ésta manera bloquear o alterar el mecanismo de síntesis de los virus (CIAT, 1982). Sin embargo, la mayoría de las sustancias quimioterapéuticas ensayadas han resultado fitotóxicas y la suspensión del tratamiento revierte el proceso, regresando la planta a la condición original de infección (Agris, 1970; CIAT, 1982).

Por lo tanto, ésta técnica se ha propuesto como auxiliar de otros métodos de saneamiento como el cultivo de meristemas y el microinjerto *in vitro* (Navarro, 1975, 1979; CIAT, 1982).

CUADRO III SUSTANCIAS QUIMIOTERAPEUTICAS DE MAYOR APLICACIÓN

- Antimetabolitos.	- Otros
1.- Purinas, pirimidinas y análogos de nucleósidos. 6-metil purina 2-tiouracilo 8-azaguanina Ribovirina (virasol)	1.- Fungicidas Bobistin (Metil benzamidazol-2 il- carbamato
2.- Análogos de aminoácidos. Fluoro fenil alanina	2.- Insecticidas Piperonil butóxido
3.- Inhibidores metabólicos Actinomicina D-ciclohexamida	3.- Colorantes Verde de malaquita
	4.- Hormonas 2,4-D

Tomado de CIAT (1982) (Fuente, Hollings, 1965; Quak, 1977; Mellor y Stace-Smith, 1977; Lerch, 1977).

De éstas sustancias, la ribovirina ha mostrado ser efectiva en el tratamiento de cítricos afectados por tristeza, exocortis y abigarrado infeccioso (Greno et al., 1990).

2.3.2 Termoterapia

"La termoterapia consiste en someter las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos que destruyan o disminuyan la velocidad de replicación de los virus, sin matar a la planta, y la propagación vegetativa de yemas o pequeños esquejes libres de virus obtenidos tras el tratamiento" (Navarro, 1979). Tales tratamientos térmicos incluyen, tratamiento de plantas con aire caliente en cámaras especiales (Desjardins et al., 1957; Schwarz y Green, 1972) y de material vegetativo con agua caliente y aire caliente húmedo (Grant, 1957; Olson y Rogers, 1969; Roistacher y Calavan, 1972).

Se ha sugerido que la inactivación de virus a alta temperatura se debe a que existe una síntesis y degradación simultánea del virus, y a altas temperaturas este balance se desplaza a la degradación, resultando una eventual erradicación. También se ha sugerido que a elevada temperatura el ARN viral compite desventajosamente con el ARN mensajero de la planta hospedera por el limitado número de ribosomas para sintetizar sus propias proteínas (Walkey, 1978).

Independientemente de la causa, la termoterapia ha sido satisfactoria para proveer material, de cítricos libre de virus, entre estos tristeza, virus del grupo Psorosis, amarillamiento de las nervaduras, etcétera, sin embargo es inefectiva con Exocortis y Xiloporosis (Calavan et al., 1972).

2.3.3 Embriones nucelares

Consiste en el cultivo de tejido nucelar aislado de semillas inmaduras de frutos jóvenes, para inducir la formación de embriones nucelares, y su posterior desarrollo en plantas (Navarro y Juárez, 1977; Plopper et al., 1977). Esta técnica ha sido efectiva para recobrar plantas libres de tristeza y otros virus (Bitters et al., 1972), sin embargo, la presencia de caracteres juveniles que se manifiestan como falta de producción en los primeros años, baja calidad de fruto, elevada espinosidad, etc. limitan su uso (Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1975). Inclusive se ha detectado un alto porcentaje de plantas anormales derivadas de esta técnica, y estudios bioquímicos de tales plantas indican la posibilidad de variación genética (Juárez et al., 1976; Navarro et al., 1985).

2.3.4 Microinjerto in vitro

Este método tiene sus antecedentes en el cultivo in vitro de meristemas de diferentes especies, que ha demostrado su eficacia en la obtención de plantas sanas de dalia (Morel y Martín, cit. por

Murashige et al., 1972), clavel (Villalobos, 1979), yuca (*Manihot sculenta* Crantz) (CIAT, 1980), etc.

Sin embargo, existe dificultad para realizar cultivos exitosos de meristemas de plantas leñosas, dentro de estas los cítricos (Bitters et al., 1972; Navarro y Juárez, 1977; Keng et al., 1978; González, 1985), ya que en algunos intentos los explantes fueron mantenidos *in vitro*, pero no manifestaron un desarrollo significativo (Murashige et al., 1972), o las plantas resultantes presentaron enanismo, sin tendencia a florecer (Méndez, 1983).

La técnica de microinjerto *in vitro* en cítricos fue iniciada con el trabajo de Murashige et al. (1972), tomando en cuenta la baja tendencia de los explantes meristemáticos a diferenciarse. Aunque el resultado de injertos exitosos fue relativamente bajo (5% a 40% en diferentes experimentos), si se notó la bondad del sistema en la obtención de plantas libres de virus, incluyendo al viroide de la Exocortis, con el que la termoterapia había fallado hasta entonces.

Posteriormente Navarro et al. (1975) obtuvieron porcentajes de prendimiento mayores, y un porcentaje de sanidad superior al 80%, siendo prácticamente del 100% para Tristeza, Abigarrado infeccioso, Exocortis, Xiloporosis y también, en otros experimentos, para *Spiroplasma citri* (Roistacher et al., 1976). Se determinó también la influencia que tienen el tamaño y fuente de ápices en el prendimiento y generación de plantas sanas (Navarro, 1976). Inicialmente hubo dificultad para erradicar el complejo virósico Psorosis A código P-209, siendo eliminado posteriormente por Roistacher y Kitto (1977) con la misma técnica.

Las plantas derivadas de microinjerto *in vitro* no manifiestan las características indeseables de las plantas obtenidas por cultivo de tejido nucelar, y a semejanza del cultivo de meristemas *in vitro* que no induce variación genética (Walkey, 1978), se descubrió que ésta ventaja también puede atribuirse a la técnica de microinjerto *in vitro*, ya que frutos colectados en cultivares derivados de plantas sometidas a microinjerto fueron altamente uniformes (Nauer et al., 1983).

Tusa et al. (1978) modificó el sistema usando condiciones diferentes a las usadas por Navarro et al. (1975), obteniendo un porcentaje promedio del 50%. Edriss y Burger (1984) encontraron al citrange Carrizo (*P. trifoliata* X *C. sinensis*), mejor que al citrange Troyer.

2.3.5 Estudios en México

Los trabajos encaminados a implementar una técnica de microinjerto en México han tomado como base la metodología descrita por Navarro et al. (1975). Azaola (1979) realizó ensayos con el patrón citrange Troyer, junto con *C. macrophylla* y naranjo agrio

(*C. aurantium*), donde se manifiesta al citrange Troyer superior al *C. macrophylla*, sin embargo no reporta datos sobre el patrón agrio.

Cedano (1981) obtuvo resultados con citrange Troyer usando nuevos métodos de implantación del ápice en el patrón. Este trabajo se reportó posteriormente sin incluir el aspecto fitopatológico (Cedano et al., 1982).

Actualmente los trabajos en microinjertos no han manifestado cambios en la utilización de nuevas metodologías y materiales (Chagolla, 1990).

2.4 Conservación de germoplasma

El método más generalizado de conservación de material de cítricos libre de virus se realiza en invernadero o en campo (Navarro et al., 1985; Méndez, comunicación personal). Este método, además de ser sustancialmente caro, no provee un completo control contra insectos vectores de patógenos (Esau, 1961; Withers, 1980 a)), y ofrece riesgos de una nueva infección. Además estos métodos convencionales están sujetos a riesgos de pérdidas catastróficas debidas a ataque de plagas, desórdenes climáticos, desastres naturales y causas económicas y políticas (Dodds y Roberts, 1985).

Se han realizado estudios de métodos que excluyan este riesgo. Uno de estos es el uso de temperaturas ultra bajas por medio de sistemas enfriados por nitrógeno líquido (Withers, 1980 b); Marín y Durán-Vila, 1988), denominado criopreservación (Dodds y Roberts, 1985), éste método reduce o hace cesar la división celular, la cual incide directamente con la tasa de mutación (Henshaw et al., 1979), lo que garantiza la conservación de las características del material almacenado.

Otras técnicas de almacenamiento *in vitro* involucran tasas de crecimiento mínimas, tales técnicas tienen un uso importante en varios centros de investigación internacionales, ya que el material así almacenado es de gran disponibilidad para su uso, se visualiza fácilmente si es viable (Wilkins y Dodds, 1983) y su traslado, incluso internacionalmente, es efectuado fácilmente y con seguridad (Espinoza et al., 1984).

Los principales métodos usados para suprimir el crecimiento en cultivos *in vitro* son tres:

Alteración de las condiciones físicas, por ejemplo la temperatura o la composición gaseosa dentro del cultivo.

Alteración del medio basal, usando concentraciones de nutrientes abajo o arriba del nivel óptimo.

Suplementación del medio con inhibidores específicos del crecimiento, como el ácido absísico, o componentes osmorreguladores, tales como el manitol y el sorbitol (Caplin, 1959; Sakai y Sugawara, 1973; Bannier y Steponkus, 1976; Henshaw et al., 1979; Dougall, 1980).

2.5 Justificación

Debido a que la mayoría de trabajos realizados en microinjerto involucran al citrange troyer (*P. trifoliata* X *C. sinensis*), u otros híbridos (citrango carrizo, citrumelo sacaton (*P. trifoliata* X *C. paradisi*), que son poco usuales localmente, se justificó la necesidad de conocer la respuesta a la técnica implementada por Navarro et al. (1975), de patrones adaptados a condiciones edáficas locales y resistencia a enfermedades potencialmente peligrosas, como la tristeza, y que además sean de fácil adquisición.

Puesto que la técnica de microinjerto *in vitro* para cítricos ha demostrado ampliamente su eficacia en la obtención de plantas sanas, en este estudio se hizo énfasis en la instalación de microinjertos utilizando los dos patrones mas usados en la propagación de variedades comerciales de cítricos, que son el naranjo agrio (*C. aurantium*) y el naranjo dulce (*C. sinensis*). De igual manera, se consideró interesante conocer la respuesta de estos patrones a condiciones de confinamiento *in vitro* a largo plazo, para la determinación de condiciones físicas y químicas adecuadas para su conservación como fuente de germoplasma, estas condiciones *in vitro* garantizan el control absoluto de vectores de patógenos que puedan propiciar una reinfección en material sano obtenido por medio de microinjerto, lo cual no ocurre cuando se utilizan sistemas convencionales de invernadero, o inclusive en sistemas donde se use malla antipulgón, ya que eventualmente podrían introducirse por descuido o por ser de tamaño muy pequeño, lo cual no ocurre en sistemas *in vitro*, garantizándose de esta manera la completa sanidad del material confinado.

2.6 Hipótesis

a) La compatibilidad existente entre los patrones de naranjo agrio y naranjo dulce y variedades comerciales de cítricos, a nivel macroinjerto, será mantenida al efectuar la técnica de microinjerto *in vitro*.

b) Es posible el mantenimiento a largo plazo de germoplasma de cítricos viable, bajo condiciones *in vitro*.

2.7 Objetivos

Objetivo general

Conocer la respuesta de patrones locales a la técnica de microinjerto, que puedan ser alternativos al patrón citrange troyer, y su comportamiento en condiciones que puedan retardar su crecimiento, para ser conservados como fuente de yemas, asegurando de esta manera la total sanidad del material contenido.

Objetivos específicos

- Determinar la respuesta del naranjo dulce y naranjo agrio como patrones para microinjerto.

- Determinar el tratamiento adecuado de las varetas de cítricos como fuentes de ápices para el microinjerto.

- Determinar el tiempo máximo que puedan ser mantenidos los microinjertos en el medio líquido descrito por Navarro y colaboradores (1975).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

El material biológico consistió en:

a) **Patrones.**- Se utilizaron 169 plántulas obtenidas de semilla de Naranja agrio (*Citrus aurantium*) (86 plántulas) y Naranja dulce (*C. sinensis*) (76 plántulas).

El criterio de selección fue por su compatibilidad con un amplio rango de especies y variedades a nivel de macroinjerto, además el patrón dulce muestra resistencia a Tristeza y Exocortis (Morin, 1985). El patrón agrio es resistente a gomosis y se adapta a una gran variedad de suelos (Palacios, 1978).

Se utilizaron 148 semillas de naranja dulce que se obtuvieron de frutos de naranja Valencia (*C. sinensis*) y 162 de naranja agrio (*C. aurantium*) obtenidas de frutos de árboles de huertos locales.

b) **Fuente de ápices**¹.- Este material estuvo constituido por varetas de aproximadamente 40 cm. de las siguientes variedades:

- Toronjas (*C. paradisi*)
 - Redblush (10 varetas)
 - Marsh (11 varetas)
- Naranjas (*C. sinensis*)
 - Pineapple (10 varetas)
 - Queen (11 varetas)
 - Valencia (7 varetas)
 - Hamlin (10 varetas)
- Mandarinas (*C. reticulata* Blanco)
 - Nova (10 varetas)
 - Clementine (6 varetas)
- Tangelo Orlando (*C. reticulata* X *C. paradisi*)
 - (11 varetas)
- Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* X *C. sinensis*)
 - (10 varetas)
- Lima dulce de Palestina (*C. limettioides* Tanaka), conocida localmente como limón real (10 varetas)
- Limón mexicano (*C. aurantifolia*)
 - (10 varetas)

¹Todo el material vegetativo, exceptuando limón real y limón mexicano, que proceden de huertos locales, fue proporcionado por el programa de cítricos del campo experimental General Terán (CAEGET) de Nuevo León. Las varetas de citrange Troyer se obtuvieron de plantas germinadas en laboratorio.

El criterio para elegir los materiales donantes de ápices se basó en que son variedades comerciales importantes en la citricultura nacional (Ramírez, 1982).

3.1.1 Obtención de patrones

Se les eliminaron los tegumentos a las semillas maduras y sanas, y se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 20 seg., inmediatamente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 0.9% de cloro activo, preparada a partir de una solución comercial ("Cloralex"); a continuación se pasaron a la cámara de flujo laminar y se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril. El agua se eliminó y las semillas se pasaron a una caja petri con papel filtro estéril, de donde se tomaron con unas pinzas estériles y se sembraron en medio de cultivo sólido (3.3.1), una por cada tubo de ensayo.

Todo el instrumental utilizado fue desinfectado por medio de flameado, antes de cada aislamiento, usando etanol al 90%. El papel filtro dentro de la caja de petri se renovó frecuentemente.

Los tubos con las semillas destinadas para microinjerto se incubaron en ausencia de luz para favorecer la etiolación, pues según Navarro et al. (1975), el porcentaje de éxito con patrones etiolados es mucho mayor que el obtenido con patrones verdes, debido a que el tejido etiolado está menos diferenciado, y existe una relación inversa entre el grado de diferenciación y la capacidad de regeneración (Herman y Hess, 1963).

Con el fin de establecer una comparación entre las características cualitativas de los patrones etiolados y los generados en régimen normal de iluminación, se sembraron 10 semillas de naranjo agrio y 10 de naranjo dulce, en un régimen de iluminación de 3000 lux y fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad.

La incubación se efectuó a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa dentro del incubador fue del 55%. El tiempo de incubación fue de 2 semanas.

3.1.2 Medio de germinación aséptica de semillas (GA)

Al medio basal de sales de Murashige y Skoog (MS), sin vitaminas ni reguladores del crecimiento, aforado a un 50% de su volumen total se ajustó el pH a 5.7. El volumen restante se adición con un 0.8% p/v de agar-agar (MERCK) y se calentó en una parrilla eléctrica con agitador magnético, sin llegar a ebullición hasta adquirir un color ambarino y sin presencia de grumos, vertiéndose en éste momento en la solución de sales de MS, agitándose hasta la homogeneización de la mezcla.

El medio se sirvió en tubos de 25 X 150 mm en dosis de 20 ml por tubo y se sometieron a esterilización en autoclave a 120° C de temperatura y 105 Kg/cm² de presión durante 20 minutos.

3.1.3 Obtención de los ápices

Las varetas generadoras de los ápices donantes de meristemas para el microinjerto se cortaron en tramos de 12 a 13 cm., en los que había 4 ó 5 yemas axilares y se instalaron en tubos de ensayo de 25 X 150 mm. conteniendo 10 ml de solución de Benlate al 0.1% p/v.

Antes de su instalación en confinamiento húmedo se eliminó de las varetas la tierra, el polvo, tallos en abscisión, etc., por limpieza superficial con agua corriente y detergente, y se sumergieron en solución acuosa de benlate a 1 g/l durante 25 minutos.

La aparición eventual de hongos en las cicatrices de los brotes escindidos se eliminó con la misma solución fungicida de Benlate a 1 g/l.

3.1.4 Sustrato de mantenimiento de varetas (OB)

El sustrato de mantenimiento de varetas y control de eventual contaminación por hongos consistió en una solución acuosa de Benlate al 0.1% p/v, sirviéndose en tubos de 25 X 150 mm en dosis de 10 ml por tubo.

3.2 Descripción de la técnica de microinjerto

Se utilizaron como portainjertos las plántulas etioladas obtenidas a partir de semilla según se describe en 3.1.1.

3.2.1 Preparación del portainjerto

El patrón etiolado se sacó del tubo de ensayo y bajo un microscopio estereoscópico, cuya platina fue desinfectada, se le eliminaron los cotiledones y las yemas axilares y se decapitó dejando una porción del epicotilo de 1.0 a 1.5 cm. En la porción superior del epicotilo se realizó una incisión en forma de "T" invertida, por medio de dos cortes perpendiculares de 1 mm aproximadamente, sin afectar a la médula, de este modo quedó listo para recibir el explante meristemático.

La raíz se cortó dejando una porción de 2 a 3 cm la cual sirvió para fijarse al puente de papel filtro contenido en el medio de mantenimiento de plantas microinjertadas.

3.2.2 Preparación de la yema

El injerto lo constituyó la yema compuesta por la región meristemática con 2 ó 3 primordios foliares, obtenida de los brotes de las varetas mantenidas en confinamiento húmedo, a los que se les sometió a la siguiente desinfección:

- 1.- 30 min. en etanol al 70%.
- 2.- 12 min. en hipoclorito de sodio al 0.48% de cloro activo.
- 3.- 3 enjuagues en agua destilada estéril en cámara de flujo laminar

3.2.3 Establecimiento del microinjerto

A través del microscopio se aisló cuidadosamente el meristemo y se colocó mediante una microcuchilla en el borde inferior del corte de "T" invertida practicado al patrón. Una vez colocado se cerró la incisión, quedando así establecido el microinjerto.

Este se colocó en un tubo de ensayo que contenía medio de cultivo líquido (3.2.4), quedando sostenido por un puente de papel filtro al que se le practicó un orificio en el que se introdujo la porción de raíz del patrón.

Con propósito de asépsia todo el instrumental usado se flameó con etanol al 96% antes de cada corte o aislamiento así como la boca del tubo de ensayo antes y después de instalar el microinjerto.

3.2.4 Medio de mantenimiento de plantas microinjertadas (MM)

Se usó el medio utilizado por Navarro et al. (1975), que contiene el medio basal de sales de MS, adicionado con 0.2 mg/l de Tiamina-HCl + 1.0 mg/l de Piridoxina-HCl + 1.0 mg/l de Ácido nicotínico + 100 mg/l de Inositol + Sacarosa al 7.5% p/v.

El medio se ajustó a un pH de 5.7 y se sirvió líquido en tubos de 25 X 150 mm, en dosis de 25 ml por tubo, colocándose un puente de papel filtro perforado en el centro como soporte del microinjerto, cubriéndose con tapones de polipropileno y esterilizándose en autoclave durante 20 minutos.

Se realizaron 169 microinjertos en total, correspondiendo 86 a los microinjertos sobre naranjo agrio y 76 sobre naranjo dulce, a continuación se ilustran las principales fases que comprende el establecimiento del microinjerto (Figura 3), y las variedades que corresponden a cada microinjerto

CUADRO IV DESCRIPCIÓN VARIETAL DE MICROINJERTOS *IN VITRO*

PATRÓN	NUMERO DE MICROINJERTOS REALIZADOS POR VARIEDAD*											
	TR	TM	NP	NQ	NV	NH	MN	MC	tO	LR	LM	CT
Agrío	12	9	5	5	4	4	10	3	4	10	10	10
Dulce	10	9	1	0	1	1	12	6	5	10	11	10

*Las abreviaturas corresponden a las siguientes variedades:
(Página siguiente).

- | | |
|--|--|
| <p>a) Toronja (<i>C. paradisi</i>)
TR Redblush
TM Marsh</p> | <p>d) Mandarina (<i>C. reticulata</i>)
MN Nova
MC Clementine
MF Fairchild</p> |
| <p>b) Naranja dulce (<i>C. sinensis</i>)
NP Pineapple
NQ Queen
NV Valencia
NH Hamlin</p> | <p>e) Tangelo (<i>C. reticulata</i> X
<i>C. paradisi</i>)
tO Tangelo Orlando</p> |
| <p>c) Citrange (<i>P. trifoliata</i>
X <i>C. sinensis</i>)
CT Citrange Troyer</p> | <p>f) LM "Limón real" (<i>C.</i>
<i>limetticoides</i>)</p> <p>g) LM Limón mexicano (<i>C.</i>
<i>aurantifolia</i>)</p> |

3.2.5 Mantenimiento de germoplasma.

Las condiciones de desequilibrio osmótico proporcionadas por sustancias osmorreguladoras, como el manitol o sacarosa en altas concentraciones, han sido ensayadas por Henshaw et al. (1980) y Espinoza et al. (1984) en la conservación de germoplasma de papa reduciéndose el espacio internodal y la tasa de crecimiento de manera eficiente, por esta razón, se propuso al mismo medio MM como medio de mantenimiento a largo plazo, ya que su alta concentración de sacarosa podría inhibir la tasa de crecimiento por estrés osmótico, como una extrapolación de los resultados obtenidos por los investigadores anteriormente citados.

3.2.6 Incubación

El mantenimiento de plantas microinjertadas se hizo dentro del incubador a una temperatura de $27^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, humedad relativa del 55%, un régimen de iluminación de 3000 lux y fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad.

3.2.7 Observaciones

Las observaciones en patrón dulce y patrón agrio se realizaron con una periodicidad de 2 días, por medio de microscopio estereoscópico de 40 a 50 aumentos, debido a que la ausencia de

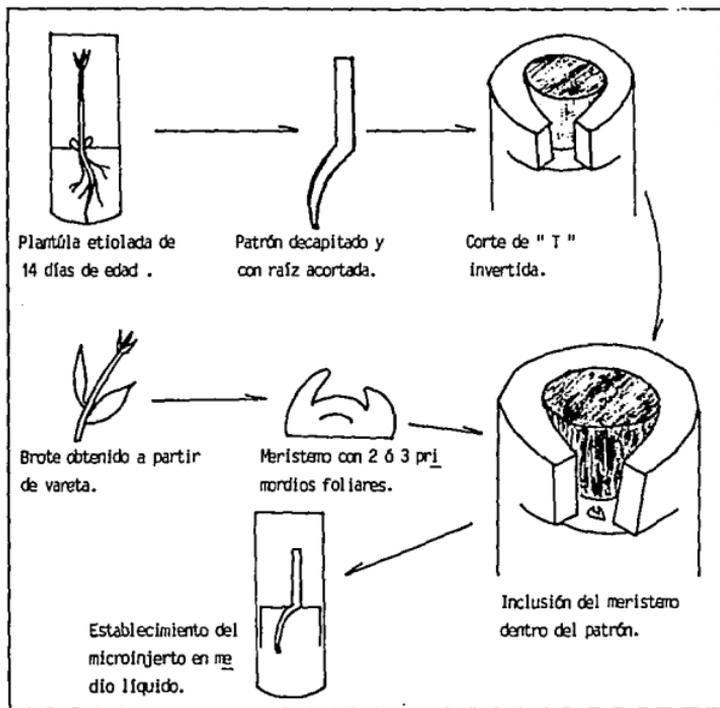


Fig. 3 PRINCIPALES FASES DEL ESTABLECIMIENTO DEL MICROINJERTO

características distintivas, como son las hojas trifoliadas en el citrange Troyer, impidió la determinación a simple vista si el meristemo había sido aceptado, de ésta manera se determinó la evolución del mismo, pudiéndolo distinguir así de eventuales brotes adventicios cercanos al corte de "T" invertida.

CUADRO V CONSTITUYENTES DE LOS MEDIOS UTILIZADOS

MEDIO	CONSTITUYENTES
GA	Sales de MS, sin vitaminas ni reguladores del crecimiento.
OB	Solución acuosa de Benlate 1 g/l.
MM	Sales de MS + 0.2 mg/l de Tiamina-HCl + 1.0 mg/l de Piridoxina-HCl + 1.0 mg/l de Acido Nicotínico + 100 mg/l de Inositol + 75 000.00 mg/l de saca-rosa.

3.4 Trasplante a suelo

Se utilizó como sustrato de trasplante una formulación artificial de tierra, desarrollada para cítricos en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del campo agrícola experimental Zacatepec, que consistió en un 25% de bagazo de caña, 50% de arena de río y un 25% de limo.

Se utilizaron recipientes de unical de 500 ml de capacidad con fondo perforado para facilitar el drenaje y evitar posibles contaminaciones por exceso de humedad.

Como solución fertilizante se usó la formulación mineral de Murashige y Skoog en el momento de trasplante, y se colocaron bolsas de polietileno para minimizar la pérdida de humedad, y se instalaron en incubador durante dos semanas como fase inicial de adaptación, con exposición creciente a condiciones ambientales externas hasta la completa adaptación de las plantas, cultivándose posteriormente en condiciones normales de invernadero.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los portainjertos

4.1.1 Características asociadas a los portainjertos

El medio de cultivo (GA) utilizado para la germinación de patrones indujo satisfactoriamente la obtención de portainjertos apropiados para el microinjerto, presentando un índice de germinación del 82%, por lo que no se consideró necesaria la adición de sustancias reguladoras del crecimiento o sacarosa.

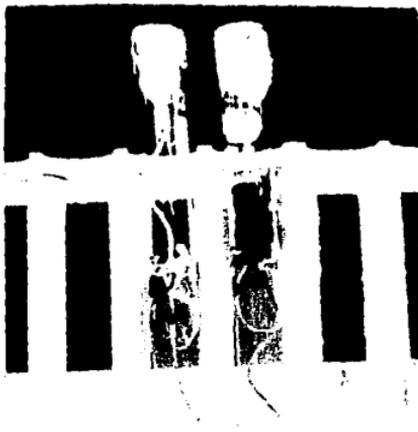


Fig. 4 Patrones de naranjo agrio de dos semanas de edad. Izq. Etiolado. Der. Germinado bajo régimen normal de iluminación.

a Navarro (1975,1979) obtener mayor porcentaje de éxito con patrones etiolados que con patrones verdes.

Las plántulas obtenidas durante este trabajo mostraron características semejantes a los reportados por Navarro (1979), siendo etiolados, sin hojas expandidas y el epicotilo mas largo que de las plantas testigo generadas bajo régimen de iluminación (Cuadro VI), también la corteza del tallo era mas succulenta y fácil de cortar que de plantas generadas en fotoperíodo (Figura 4), apreciándose de esta manera un mejor sustrato para la implantación del material vegetativo. No se consideró necesario probar la respuesta de patrones obtenidos bajo iluminación, puesto que existen pruebas de que el tejido etiolado posee una capacidad de regeneración mayor, debido a una menor diferenciación (Hermann y Hesse, 1963 citado por Navarro, 1979), lo que permitió

CUADRO VI TALLA PROMEDIO EN mm Y NÚMERO DE HOJAS EN PATRONES ETIOLADOS Y GENERADOS BAJO FOTOPERÍODO.

	PATRÓN ETIOLADO			PATRÓN TESTIGO		
	tallo	raíz	# de hojas	tallo	raíz	# de hojas
Naranja agrio	75.4	64.6	3	33.7	65.6	8
Naranja dulce	73.2	72.4	2	27.9	65.3	7

4.2 Variedades utilizadas como injertos

4.2.1 Respuesta de la fuente de yemas

Las varetas mantenidas en confinamiento húmedo continuamente mostraron renuevos, los cuales fueron la fuente de ápices para la instalación de los microinjertos, generándose tallos adventicios en las cicatrices de renuevos anteriormente escindidos, o desprendidos por abscisión.

Las varetas utilizadas en este trabajo mostraron su vitalidad y 24 de ellas la mantuvieron durante un lapso comprendido de 29 meses. Y 8 varetas viables durante 23 meses, de las cuales seis del primer bloque, hasta su última observación en el 29º mes aún presentaban renuevos, y todas tenían yemas adventicias en las cicatrices de renuevos anteriores (Figs. 5 y 6).

CUADRO VII VARETAS VIABLES DESPUÉS DE 23 MESES DE CONFINAMIENTO.

	Variedad					
	TR	TM	MN	NV	NQ	NH
Sobrevivientes	4	4	5	3	2	1

CUADRO VIII VARETAS VIABLES DESPUÉS DE 29 MESES DE CONFINAMIENTO.

	Variedad				
	MN	NQ	TR	LR	NV
Sobrevivientes	2	2	2	1	1

Esta respuesta plantea una situación con posibilidades favorables en el aspecto fitopatológico de esta metodología, ya que podrían implementarse tratamientos a largo plazo con sustancias inhibitorias de la concentración de virus (Agrios, 1970), tales como el verde de malaquita, que Oshima y Livingston (1961) ensayaron con éxito en el incremento del porcentaje de ápices caulinares libres del virus X de la papa, y por Navarro et al. (1976) en el incremento de microinjertos de cítricos libres de Exocortis, u otras sustancias ensayadas, (Price, 1963; Ishii et al., 1967; Davis et al., 1968; Agrios, 1970), o tratamientos a largo plazo por medio de termoterapia, o la conjunción de ambos sistemas, lo que sería interesante, ya que plantearía el uso de explantes meristemáticos mas grandes; esto ha probado ser de influencia positiva sobre el éxito del microinjerto, pero reduce la obtención de plantas sanas (Navarro et al., 1976). Sin embargo, el uso de sustancias quimioterapéuticas, termoterapia a largo plazo, ó la conjunción de ambos podría disminuir el efecto negativo que tiene el mayor tamaño del implante en la obtención de plantas sanas, y aumentar el porcentaje de prendimiento.

Todas las varetas mantenidas en confinamiento fueron instaladas en condiciones no asépticas, ocurriendo una contaminación por hongos del 100 %, ésta contaminación logró controlarse eficientemente aplicando la misma solución de benlate a 1 g/l, por medio de un cotonete en la región contaminada.



Fig. 5 Vareta de naranja valencia de 21 meses de confinamiento, mostrando brote joven, sobre cicatriz de renuevos anteriores.



Fig. 6 Vareta de toronja redblush de 21 meses de confinamiento con yemas adventicias en la cicatriz de renuevos anteriores.

A pesar de que las varetas fueron instaladas en condiciones no asépticas, la presencia de bacterias no ofreció problemas ya que sólo se manifestó a causa de descomposición de brotes escindidos, ésta condición se corrigió separando el material descompuesto, e instalando las varetas en medio fresco.

4.2.2 Características de los ápices generados *in vitro*



Fig. 7 Ápice caulinar de limón real mostrando un meristemo con tres primordios foliares.

Los ápices generados por éste procedimiento fueron adecuados tanto en tamaño, facilidad de aislamiento del meristemo, consistencia y resistencia del tejido al proceso de desinfestación, y no presentaban diferencia cualitativa con ápices obtenidos *in vivo*, teniendo las mismas características los ápices obtenidos de varetas con mas de 24 meses de confinamiento *in vitro* (Fig. 7).

La longitud alcanzada por los brotes osciló de 1.5 a 2.0 cm aproximadamente, y permanecían por espacio de una semana antes de tener lugar la abscisión, dejando una cicatriz, la cual fue generadores en cada caso, de nuevos brotes en lapsos de tiempo que no se determinaron, esto hubiera sido conveniente para establecer si existe periodicidad en el brote de las yemas adventicias, y cual sería el comportamiento asociado a cada variedad, bajo éstas condiciones, para así sincronizar la disponibilidad de brotes como fuente de meristemas y de plántulas germinadas, puestas en fase favorable con un pretratamiento antes de instalarse *in vitro*.

4.3 Características de los microinjertos

Se adoptó el método de incisión tipo "T" invertida (Fig. 8) porque es el procedimiento utilizado en la mayoría de trabajos realizados a la fecha, ya que según Navarro (1979) los brotes adventicios producidos por el patrón se originan fundamentalmente en el anillo vascular en la zona de corte del epicotilo (Fig. 9), sin embargo (Cuadro IX), fue común la presencia de tallos adventicios generados en la zona medular dentro del corte de "T" invertida (Fig. 9), a diferencia del trabajo de Navarro (1979), donde fueron poco frecuentes, también fue usual la generación de tallos adventicios en el anillo vascular y en las yemas axilares del área de los cotiledones, a pesar que estos habían sido escindidos con anterioridad al establecimiento del microinjerto.

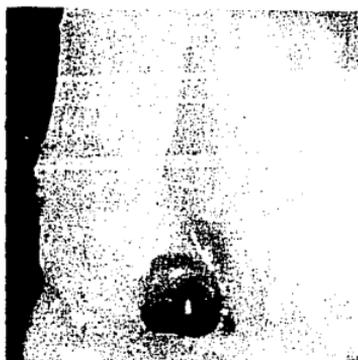


Fig. 8 Meristemo con 5 primordio foliars, dentro del corte de "T" invertida, practicado a un patrón dulce.

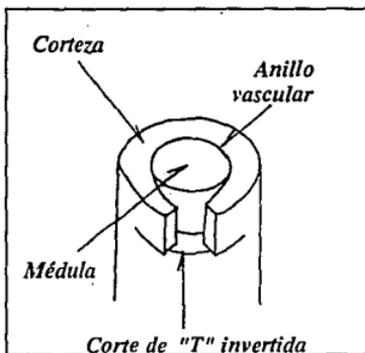


Fig. 9 Representación diagramática de las diferentes estructuras en un patrón con corte de "T" invertida.

CUADRO IX LOCALIZACIÓN DE TALLOS ADVENTICIOS GENERADOS POR EL NARANJO AGRO Y EL NARANJO DULCE.

	% DE TALLOS ADVENTICIOS		
	anillo vascular	zona medular interna	área de los cotiledones
Naranja agrio	47.37	31.58	21.05
Naranja dulce	70.37	18.52	11.11

No hubo problemas en la determinación del comportamiento de los meristemas injertados, estos se distinguían fácilmente de los brotes adventicios generados por el patrón, ya que por lo general mostraban, en su fase temprana cuando poseían un tamaño semejante al meristemo, una forma cónica, con un par de primordios empalmados uno sobre otro, a diferencia de los implantes en los que se distinguía el domo meristemático rodeado por los dos o tres primordios foliares con que fue aislado. Los trabajos con patrones sin caracteres distintivos como las hojas trifoliadas del citrange Troyer y sus híbridos, puede hacerse por medio de la observación microscópica periódica del implante meristemático durante su desarrollo.

El comportamiento de los meristemas dentro del corte de "T" invertida no fue regular, un 43.16% sobre naranja agrio y un 36%

sobre naranjo dulce sobrevivieron un término de 14 días, un 32.5% sobre naranjo agrio y un 33.6% sobre naranjo dulce permanecieron vivos en el término de 15 a 28 días, y un 28.85% sobre naranjo agrio y un 23.8% sobre naranjo dulce mantuvieron su viabilidad desde 28 días hasta un término máximo de 210 días (cuadro X) sin mostrar desarrollo, la mayoría presentaban tallos adventicios (Cuadro XI), y la eliminación de éstos no ofreció cambios en el desarrollo del meristemo.

CUADRO X PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LOS MERISTEMOS DENTRO DEL CORTE DE "T" INVERTIDA.

PATRÓN	% DE SUPERVIVENCIA		
	t < 15 DÍAS	15 A 28 DÍAS	t > DE 28 DÍAS
AGRIO	43.16	32.5	28.8
DULCE	36.0	33.6	23.8

CUADRO XI PORCENTAJE DE PLANTAS GENERADORAS DE TALLOS ADVENTICIOS

	% de plantas generadoras de tallos adventicios
Naranjo agrio	69.76
Naranjo dulce	57.14

4.3.1 Análisis estadístico

Con el fin de definir el comportamiento asociado a los patrones con las variedades ensayadas, se realizó un análisis factorial de los datos de sobrevivencia de los meristemas, obtenidos a lo largo de este experimento, en el siguiente arreglo de variables:

$fA \times fB \times n$

Donde:

fA= Patrones= 2

fB= Variedades= 12

n= Repeticiones= 12

En un diseño completamente al azar, obteniéndose la siguiente tabla de análisis de varianza:

CUADRO XII TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA, EN ARREGLO FACTORIAL DE 2 FACTORES, EN UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR.

FUENTE	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F
A	1	1 096.68	1 096.681	0.59
B	11	99 267.90	9 024.355	4.84
AB	11	30 007.07	2 727.915	1.46
ERROR	264	492 466.00	1 865.402	

De esta manera la tabla de ANDEVA nos muestra , en base al valor F, a un alfa del 0.05%, que las diferencias son significativas, y están determinadas por el factor B, que corresponde a las diferentes variedades, tomando en cuenta este resultado se realizó la prueba de Duncan, que arrojó los siguientes resultados (Cuadro XIII), y cuyo desglose, tanto de ésta como del análisis de varianza se muestran en el apéndice.

CUADRO XIII ORDEN ARREGLADO DE LA PRUEBA DE DUNCAN DE LOS DATOS DE SOBREVIVENCIA DE LOS MERISTEMOS INJERTADOS.

Promedio 1, variedad toronja redblush	(TR) = 69.67	A
Promedio 10, variedad limón real	(LR) = 40.46	B
Promedio 11, variedad limón mexicano	(LM) = 31.33	BC
Promedio 7, variedad mandarina nova	(MN) = 26.00	BCD
Promedio 9, variedad tangelo Orlando	(tO) = 20.96	BCD
Promedio 8, variedad mand. clementine	(MC) = 19.71	BCD
Promedio 12, variedad citrange troyer	(CT) = 18.50	BCD
Promedio 2, variedad toronja marsh	(TM) = 15.25	BCD
Promedio 3, variedad naranja pineapple	(NP) = 6.71	CD
Promedio 5, variedad naranja valencia	(NV) = 4.42	CD
Promedio 6, variedad naranja hamlin	(NH) = 2.79	CD
Promedio 4, variedad naranja queen	(NQ) = 1.29	D

Para tener una herramienta mas en la discusión de estos resultados, se elaboró una gráfica de barras tomando las medias aritméticas de los diferentes tratamientos (fig. 10), de esta manera, es evidente que los mejores tratamientos corresponden a toronja redblush sobre naranjo agrio y limón real sobre naranjo

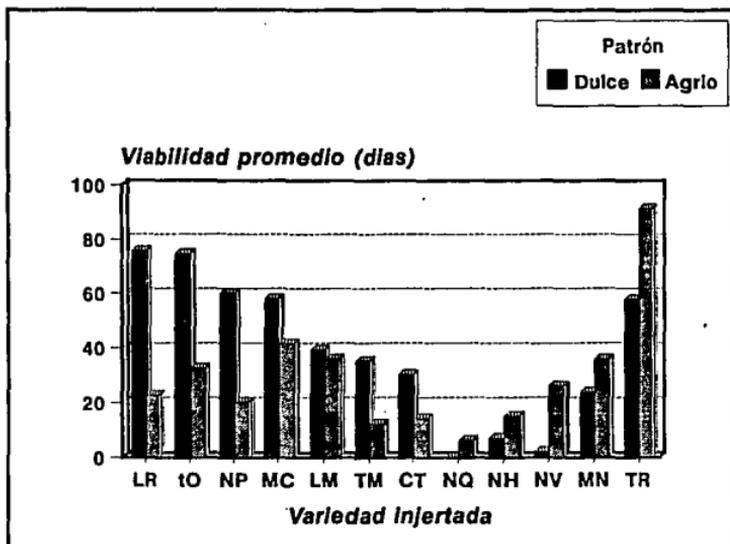


Fig. 10 Viabilidad del microinjerto para las diferentes variedades injertadas.

dulce, los cuales obtuvieron porcentajes de prendimiento del 33% y del 20% respectivamente (cuadro XIV), el tratamiento siguiente en importancia fue el correspondiente a limón mexicano, que fue estadísticamente significativo y además obtuvo éxito tanto en naranjo agrio, como en naranjo dulce, los tratamientos estadísticamente semejantes entre sí fueron los correspondientes a mandarina nova, tangelo Orlando, mandarina clementine, citrange troyer y toronja marsh, sin embargo, a pesar de estos resultados, es necesario colocar al tangelo Orlando y a la toronja marsh en un rango superior al obtenido por la prueba de Duncan, ya que ambos obtuvieron porcentajes de prendimiento sobre naranjo dulce del 20% y del 11% respectivamente (cuadro XIV).

En el rango inferior quedaron colocados los tratamientos relativos a naranja pineapple, naranja valencia y naranja Hamlin, y como el peor tratamiento el correspondiente a naranja queen, esto debido a que solo pudo realizarse sobre naranjo agrio y no hubo posibilidad de contraste.

La gráfica de viabilidad promedio muestra también que algunas variedades que no obtuvieron prendimiento en ningún patrón muestran cierta afinidad hacia un patrón u otro, de esta manera, tomando en cuenta los resultados de la prueba de Duncan y la gráfica de la figura 10, las variedades que mostraron cierta afinidad por el patrón dulce fueron mandarina clementine, citrange troyer y naranja pineapple, y para naranjo agrio, mandarina nova. Estos resultados muestran que estas variedades reúnen las condiciones que las hacen propias para un estudio posterior en el que se manejen diferentes formulaciones o modificaciones al medio sugerido por Navarro et al. (1975), aunado a tratamientos de los meristemas con sustancias reguladoras del crecimiento como el AIA y el ANA, tratamientos que han comprobado su eficacia en el aumento del prendimiento en propagación de cítricos a nivel de macroinjerto (Weaver, 1983).

CUADRO XIV PORCENTAJE DE MICROINJERTOS PRENDIDOS SOBRE NARANJO DULCE Y NARANJO AGRIO.

	% DE MICROINJERTOS PRENDIDOS				
	Tangelo Orlando	Limón Real	Toronja Marsh	Limón Mexicano	Toronja Redblush
Naranjo dulce	20.0	20.0	11.1	9.1	0.0
Naranjo agrio	0.0	0.0	0.0	10.0	33.0

4.4 Comportamiento a largo plazo

El bajo porcentaje de microinjertos prendidos, que fue del 4.65% para naranjo agrio y de 6.6% para naranjo dulce, del total de plantas microinjertadas, determinó la conveniencia de utilizar sólo los patrones de los microinjertos no prendidos para las pruebas de mantenimiento a largo plazo.

En todas las plantas mantenidas en confinamiento, el desequilibrio osmótico proporcionado por la sacarosa en alta concentración, redujo el crecimiento y la distancia internodal (Cuadro XV) (Figs. 11 y 12), de tal manera que los tallos no rebasaron la altura de 6 cm y presentaban signos de viabilidad hasta en un período máximo de 18 meses, tiempo en el cual fueron transferidos a sustrato sólido, observándose una supervivencia superior al 80%. Cabe aquí mencionar que el medio de mantenimiento a largo plazo fue el mismo en el cuál se instaló el microinjerto, ya que para evitar manipulaciones que pudieran ocasionar eventuales contaminaciones, en ningún caso se transfirieron las plantas a medio líquido fresco, no obstante sería conveniente determinar intervalos de cambio a medio fresco, puesto que se notaba cierto decaimiento de algunas

plantas, que se manifestó en abscisión de hojas y ligero amarillamiento, causado probablemente al agotamiento de los nutrientes, desarrollándose adecuadamente una vez transferidos a sustrato sólido.



Fig. 11 Tallo adventicio de naranjo dulce *in vitro* después de 4 meses de confinamiento.



Fig. 12 Tallo adventicio de naranjo dulce después de 10 meses de confinamiento, sin follaje y con la distancia internodal reducida.

CUADRO XV COMPARACIÓN DE LA DISTANCIA INTERNODAL DE TALLOS ADVENTICIOS, A 21 DÍAS Y A 18 MESES

	Distancia internodal a 21 días (mm)	Distancia internodal a 18 meses (mm)
Naranja agrio	2.75	1.99
Naranja dulce	2.40	1.40

Debido a que el objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de los patrones naranjo dulce y naranjo agrio a la técnica de microinjerto, y a que el material vegetativo de variedades comerciales no fue determinado como material afectado por alguna virosis, lo cual no excluyó esta posibilidad, no se efectuaron pruebas de indexación a ningún microinjerto prendido, ni a ninguna planta resultante de este experimento que haya tenido contacto con el material utilizado como fuente de meristemas.

V CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

El medio de germinación (GA) es eficaz para la producción de patrones de naranjo agrio (*C. aurantium*) y naranjo dulce (*C. sinensis*) con características apropiadas para la técnica de microinjerto.

El mantenimiento de varetas de cítricos, como fuente de meristemas para el microinjerto, genera material vegetativo apropiado durante períodos mayores a los 29 meses, dando lugar a condiciones que permitan ensayos a largo plazo con sustancias quimioterapéuticas o termoterapia.

El patrón dulce es adecuado para el microinjerto de las variedades tangelo Orlando, limón real, toronja marsh y limón mexicano, y el patrón agrio para toronja redblush y limón mexicano, no habiendo evidencia estadística que determine a cualquiera de ellos como mejor que otro.

El medio líquido propuesto por Navarro *et al.* (1975) permitió, en este trabajo, el mantenimiento durante 18 meses de los patrones, lo que coloca a éste como medio idóneo para mantenimiento de germoplasma *in vitro*.

En consecuencia a la relativamente larga permanencia de algunos meristemas no desarrollados, se sugiere probar formulaciones diferentes a la usada en este trabajo, en conjunción de pruebas de termoterapia y sustancias quimioterapéuticas a largo plazo con el material vegetativo, para así poder elevar los porcentajes de prendimiento, por medio de la implantación de ápices mas grandes, sin sacrificar el grado de sanidad de las plantas resultantes en ensayos donde se contemple el aspecto fitopatológico que no se incluyó en esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. N. 1970. Plant pathology. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- AGUSTI M. Y V. ALMELA. 1991. Aplicación de fitorreguladores en cítricultura. Editorial AEDOS. Barcelona, España.
- AZAOLA, E. A. 1979. Microinjerto *in vitro* de cítricos. In Memorias del simposio. La investigación y el desarrollo experimental y la docencia en CONAFRUT durante 1979. 33-37. México D. F.
- BAEZ L. Y P. BERDEJA. 1981. Ocurrencia de virosis de los cítricos en Martínez de la Torre, Ver. In Resúmenes del simposium. La investigación y el desarrollo experimental y la docencia en CONAFRUT durante 1981. p.187. México D. F.
- BANNIER C. Y P. STEPONKUS. 1976. Cold acclimation of chrysanthemus callus culture. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 101; 409.
- BITTERS W., T. MURASHIGE, S. RANGAN, E. NAUER. 1972. Investigations on establishing virus free citrus plants through tissue culture. In Price W. (Ed.) Proc. 5th. Conf. Internl Organization Citrus Virol. p. 267-71 Univ. Fla. Press, Gainesville U.S.A.
- CALAVAN E., C. ROISTACHER, E. NAUER. 1972. Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. Plant Dis. Repr. 56(11); 976-80.
- CALDERON, E. 1977. Fruticultura general. 1a parte. Ed. ECA.
- CAPLIN S. 1959. Mineral oil for conservation of plant tissue cultures. Am. J. Bot. 46; 359.
- CEDANO A. 1981. Desarrollo de microinjertos en cítricos para obtener material libre de virus. Tesis profesional. Univ. Aut. Nay. 1981. Nayarit, México.
- CEDANO A., D. HASDAI, A. MATEWS. 1982. Microinjerto de cítricos *in vitro*. In Resúmenes del simposium La investigación y el desarrollo experimental y la docencia en CONAFRUT durante 1982. p.82. México D.F.
- CIAT. 1980. El cultivo de meristemos de yuca. Guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutorial sobre el mismo tema. Contenido científico W.M.Roca, Ph.D. CIAT. Cali, Colombia.

- CIAT. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutorial sobre el mismo tema. Contenido científico W.M. Roca y Upali Jayasinghe. CIAT, Cali, Colombia.
- COCHRAN L. 1959. Citrus viruses, their economic importance and their modern methods of travel. In Wallace J. (Ed.) Citrus virus diseases. Univ. Calif. Div. of Agr. Sciences. p. 1-4
- COSTA A. Y G. MULLER. 1980. Tristeza control by cross protection. Plant disease. Junio 1980; 538-41.
- CHAGOLLA J. G. 1990. Cultivo de cítricos *in vitro*. In García H. (Ed.) Boletín informativo FIRA-BANCO DE MEXICO, Volumen XXII, num. 217:2
- DAVIS, R., R. WHITCOMB, R. STEERE. 1968. Chemotherapy of aster yellows disease. Phytopathology 58: 884.
- DESJARDINS P., J. WALLACE, C. LANGE, R. DRAKE. 1957. The suppression of tristeza virus in mexican lime seedlings by heat treatment. Plant Disease Reprtr. 41; 230-31.
- DIENER T. 1979. Viroids and viroid diseases. Ed. Willey & Sons Ltd.
- DODDS H. Y W. ROBERTS. 1985. Storage of plant genetic resources. In Experiments in plant tissue culture. 2ª Edición Cambridge Univ. Press.
- DOUGALL D. 1980. Storage of plant cell lines. In Plant tissue culture as a source of biochemicals. Stab J. Ph.D. (Ed) CRC Press Fla.
- EDRISS M. Y D. BURGER. 1984. Micrografting shoot-tip culture of citrus on three trifolite rootstocks. Scient horticulturae 23(1984); 255-59.
- ESAU K. 1961. Viruses in plant tissues, their localization and movement. In Plant, viruses and insects. Cap. 6; 75-84 Harvard Univ. Press. Cambridge, U.S.A.
- ESPINOZA N., R. ESTRADA, P. TOVAR, J. BRYAN, J. DODDS. 1984. Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germplasm. Specialized technology document. International Potato Center. Lima, Perú.
- FAWCET H. Y A. BITANCOURT. 1943. Comparative symptomatology of psorosis varieties on citrus in California. Phytopatology. 33; 837-64.

- FAWCET H. Y J. WALLACE. 1946. Evidence of the virus nature of citrus quick decline. California Citrograph. 32; 88-89.
- FRISON E. Y M. TAHER. (Eds.). 1991. Technical guidelines for the movement of citrus germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Board for Plant Genetic Resources. Roma, Italia.
- GONZALEZ H. 1984. Coccoides (*Homophra coccioidea*) asociados a árboles frutales de la región central de México. Tesis de M. en C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- GONZALEZ R. 1985. Producción de variedades de cítricos libres de virus. Subproyecto de investigación 1985. Copia fotostática. Campo Agrícola Experimental General Terán (INIFAP). Nuevo León, México.
- GRANT T. 1957. Effects of heat treatment on tristeza and psorosis viruses in citrus. Plant Disease Reprtr. 41; 230-31.
- GRENO V., M. CAMBRA, L. NAVARRO, N. DURAN-VILA. 1990. Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of citrus buds cultured in vitro. Sci. Hortic. Amst. 45;75-87.
- GUERRI J., P. MORENO, N. MUÑOZ, M. MARTINEZ. 1991. Variability among spanish citrus tristeza virus isolated revealed by double-stranded RNA analysis. Plant Pathol. 40;38-44.
- GUERRI J., P. MORENO, R. LEE. 1990. Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. Phytopathology. 80;692-698.
- GUTIERREZ J. 1985. Determinación y distribución de los principales insectos plaga de los cítricos (*Citrus spp*) en el estado de México. tesis profesional. UACH. Chapingo, México.
- HARTMANN H., D. KESTER, F. DAVIES. 1990. Herbaceous grafting. Techniques of grafting. In Plant propagation, principles and practices. 5ª Edición. Ed. Prentice Hall. N.J. EUA.
- HENSHAW G., J. STAMP, R. WESCOTT. 1979. Tissue cultures and germplasm storage. In Plant cell cultures; results and perspectives. Procs. of the Int. Workshop on Plant Cell Cultures. 277-82. Pavia, Italia.
- HERMAN D. Y C. HESS. 1963. The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 13;42-62.
- HOLLINGS M. 1965. Disease control through virus free stock. Ann. Rev. Phytopathol. 3; 267-96.

- ISHII, T., Y. DOI, K. YORA, H. ASUYAMA. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group of symptoms development of mulberry dwarf disease. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 33: 267-275.
- JUAREZ J., L. NAVARRO, J. GUARDIOLA. 1976. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle *in vitro*. Fruits. 31; 751-62.
- KENG L., W. LEI, H. JUNG, K. CHUN. 1978. A preliminar study on the shoot apex cultures of *Citrus sinensis*. In; Procs. of Symp. on Plant Tissue Culture. Pekin, 1978. Pitman Publishing Ltd. Londres.
- KRANTZ J., H. SMUTTERER, W. KOCK. 1977. Diseases, pests and weed in tropical crops. Ed. Willey & Sons.
- LERCH, B. 1977. Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by ribovirin. Phytopath. 84: 44-49.
- MARIN, M.L. Y N. DURAN-VILA. 1988. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* (L) Osback) after immersion in liquid Nitrogen. Plant cell, tissue and organ culture. 14: 51-57. Kluwer Academic Publishers, Neatherlands.
- MC GREGOR R. Y O. GUTIERREZ. 1983. Guía de insectos nocivos para la agricultura de México. Ed. Alhambra mexicana. México D.F.
- MELLOR, P.C., R. STACE-SMITH. 1977. Virus free potatoes by tissue culture. In Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinhardt y Y.P.S. Bajaj (Eds.). Springer-Verlag N.Y.
- MENDEZ R. 1983. Archivo técnico del Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Campo Agrícola Experimental Zacatepec (INIFAP). Zacatepec, Morelos.
- MENEHINI N. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença dos citrus. Biologico. 12; 285-87.
- MERRIL E. 1923. An enumeration of Philippine flowering plants. Manila bureau of printing. 2; 341.
- MOREL G. Y C. MARTIN. 1952. Guérison de Dahlias atteints d'une maladie a virus. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 235; 1324-25.
- MORENO P., J. GUERRI., N. MUÑOZ. 1990. Identification of spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. Phytopathology. 80;477-482.
- MORIN C. 1985. Cultivo de cítricos. Ed. IICA. Lima, Perú.

- MURASHIGE T., W. BITTERS, T. RANGAN, E. NAUER, C. ROISTACHER, P. HOLLIDAY. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus free citrus clones. Hortscience. 7; 118-19.
- MURASHIGE T. Y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15;473-96.
- NAUER E., C. ROISTACHER, T. CARSON, T. MURASHIGE. 1983. In vitro shoot tip grafting to eliminate citrus viruses and virus like pathogens produces uniform budlines. Hortscience. 18(3);308-9.
- NAVARRO L. 1976. The citrus variety improvement program in Spain. In Calavan E. (Ed.) Procs. 7th. Conf. Internl. Organization Citrus Virol. 198-203.
- NAVARRO L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agríos libres de virus. BoI. Serv. Plagas. 5; 127-48.
- NAVARRO L., C. ROISTACHER, T. MURASHIGE. 1975. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100(5); 471-79.
- NAVARRO L., C. ROISTACHER, T. MURASHIGE. 1976. Effect of size and source of shoot tips on psorosis A and exocortis content of navel orange plant obtained by shoot-tip grafting in vitro. In Calavan E. (Ed.) Procs. 7th. Conf. Internl. Organization Citrus Virol. 194-97.
- NAVARRO L., J. ORTIZ, J. JUAREZ. 1985. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro. Hortscience 20(2); 214-15.
- NAVARRO L. Y J. JUAREZ. 1977. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free citrus plants. Acta horticultruræ 78. Symp. on Tiss. Cult. for Hort. Pur. Ghent, Bélgica. 425-35.
- OLSON E. Y B. ROGERS. 1969. Effects of temperature on expression and transmission of stubborn disease of citrus. Plant Disease Rept. 53; 45-49.
- OSHIMA N, Y C. LIVINGSTON. 1961. The effects of antiviral chemicals on potato virus-X. Am. Potato J. 38; 294-99.
- PALACIOS J. 1978. Citricultura moderna Editorial Hemisferio Sur. pp 41-42. Buenos Aires, Argentina.

- PLOPPER L., C. OSTE, N. DE RAMALLO. 1977. Embriogénesis *in vitro* de *Citrus spp.* Rev. Ind. y Agrícola de Tucumán. 54(11); 29-36.
- PRICE, W. C. 1963. Inactivation and denaturation of plant viruses. Advan. Virus Res. 10: 171-218.
- QUAK, F. 1977. Meristem culture and virus free plants. In Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinhart y J.P.S. Bajaj (Eds.) Springer-Verlag, N.Y.
- RAMIREZ J. 1982. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el cultivo de los cítricos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Publicación especial.
- RODRIGUEZ, B. 1981. Cítricos. In Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el Estado de Nuevo León. Publicación especial # 1; 11-18.
- RODRIGUEZ, G. 1982. Producción de brotes de varetas de cítricos *in vitro*, técnica auxiliar del microinjerto. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Nuevo León, México.
- ROISTACHER C. Y E. CALAVAN. 1972. Heat tolerance of preconditioned citrus budwood for virus inactivation. In Price W. (Ed.) Proc. 5th Conf. Internl. Org. Citrus Virol. Univ. of Florida Press. Gainesville. pp 333-36.
- ROISTACHER C. Y S. KITTO. 1977. Elimination of adicional citrus viruses by shoot-tip grafting *in vitro*. Plant Disease Reprtr. 61(7); 594-96.
- ROISTACHER C., L. NAVARRO, T. MURASHIGE. 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, Exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro*. In Calavan E. (Ed.) Proc. 7th Conf. Intern. Organization Citrus Virol.
- SAKAI A. Y Y. SUGAWARA. 1973. Survival of proper callus at superlow temperatures after cold acclimation. Plant Cell Physiol. 14; 1201.
- SARH. 1992. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Tomos I y II. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de planeación.
- SCHWARZ R. Y G. GREEN. 1972. Heat requirements for symptom supresion and inactivation of greening. In Price W. (Ed.) Proc. 5th Conf. Internl. Organization Citrus Virol. Univ. of Florida Press.

- SERGE T. Y R. GRAS. 1979. Suelo y fertilidad en fruticultura. Ed. Mundi prensa. Buenos Aires, Argentina.
- SHARMA S. 1989. Factors affecting vector transmission of citrus tristeza virus in south India. Zentralbl. Mikrobiol. 144;283-294.
- SMITH . 1972. A textbook of plant virus diseases. Ed. Longman Ltd. Londres, Inglaterra.
- SWINGLE W. 1943. The botany of citrus and its relatives of the orange subfamily. In Webber H. & Batchelor L. (Eds.) The citrus industry. 1; 129-474. Univ. Calif. Press. Berkeley, Los Angeles.
- SWINGLE W. 1967. The botany of citrus and its wild relatives. Rev. by Reece P. from the 1st edition (1943). In Reuther W., Webber H., Batchelor L. (Eds.). The citrus industry. 2nd Edition. Univ. Calif. Div. of Agric. Sci. 190-430.
- TANAKA T. 1961. Citrologia. Semi-centennial commemoration papers on citrus studies. Citrologia Supporting foundation. Osaka, Japón.
- TUSA N., F. DE PASQUALE, L. RADOGNA. 1978. Research on the micrografting technology in citrus. In Procs. Intern. Soc. Citriculture. 143-45.
- VAN VUUREN S., R. COLLINS, J. DA GRACA. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. Plant disease. 77;24-28
- VILLALOBOS V. 1979. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus cariphylus*) libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos. Tesis de M. en C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- WALKEY D. 1978. In vitro methods for virus elimination. In Frontiers of plant tissue culture. Procs. 4th Intern. Congress of Plant Tissue and Cell Cultures. Univ. Calgary. Alberta, Canada.
- WALLACE J. 1957. Virus strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. Hilgardia 27;223-46.
- WALLACE J. 1959. A half century research on psorosis citrus virus diseases. Univ. Calif. Div. Agric. Sci.
- WEAVER J. 1983. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas. Mexico D. F.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- WILKINS P. Y H. DODDS. 1983. Tissue culture conservation of woody species. In Tissue culture of trees. Ed. Dodds J. H.
- WITHERS L. 1980 a). Preservation of germplasm. In Perspectives in plant cell and tissue culture. Kuasil I. (Ed.) Academic Press. 101-36.
- WITHERS L. 1980 b). Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR report. Roma, Italia.

APÉNDICE

COMPOSICIÓN DE SALES MINERALES DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Compuesto	Concentración en el medio (mg/l)
NO_3NH_4	1 650.0
NO_3K	1 900.0
$\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.0
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0
IK	0.83
$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	170.0
BC_2H_3	6.2
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25.85
EDTANa ₄	37.25

Tomado de Navarro (1979).

**SOLUCIONES MADRES PARA PREPARAR EL
MEDIO BASAL DE MURASHIGE Y SKOOG**

Solución nº	Constituyentes (mg/l)	Cant. Const./ Sol. madre
1	NO ₃ NH ₄	82 500.0
	NO ₃ K	95 000.0
	SO ₄ Mg. 7H ₂ O	18 500.0
	PO ₄ KH ₂	8 500.0
2	BO ₃ H ₃	620.0
	SO ₄ Mn. H ₂ O	2 176.0
	SO ₄ Zn. 7H ₂ O	860.0
	MoO ₄ Na ₂ . 2H ₂ O	25.0
	SO ₄ Cu. 5H ₂ O	2.5
	Cl ₂ Co. 6H ₂ O	2.5
3	IK	75.0
4	CaCL ₂ . 2H ₂ O	15 000.0
5	EDTANa ₂	1 492.0
	SO ₄ . 7H ₂ O	1 114.0

Disolver todos los constituyentes de la solución madre N^o 1 en 1 000 ml de agua; todos los de la sol. madre N^o 2 en 100 ml; el N^o 3 en 100 ml; el N^o 4 en 100 ml y el N^o 5 en 200 ml.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE SUPERVIVENCIA
DE LOS MICROINJERTOS

ANDEVA factorial para los factores:

Variable 1 con valores de 1 a 12

REP. REPETICIONES

Variable 2 con valores de 1 a 2

FA PATRÓN

Variable 3 con valores de 1 a 12

FB VARIEDAD

Variable 4

D.S. DÍAS DE SUPERVIVENCIA

Gran promedio= 21.465 Gran suma= 6182.000 Cuenta total 288

T A B L A D E P R O M E D I O S

1	2	3	4	TOTAL
1	1	1	19.514	2810.000
1	2	1	23.417	3372.000
1	1	1	69.667	1672.000
1	1	2	15.250	366.000
1	1	3	6.708	161.000
1	1	4	1.292	31.000
1	1	5	4.417	106.000
1	1	6	2.792	67.000
1	1	7	26.000	624.000
1	1	8	19.708	473.000
1	1	9	20.958	503.000
1	1	10	40.958	983.000
1	1	11	31.333	752.000
1	1	12	18.500	444.000
1	1	1	91.250	1095.000
1	1	2	7.083	85.000
1	1	3	8.417	101.000
1	1	4	2.583	31.000
1	1	5	8.667	104.000
1	1	6	5.000	60.000
1	1	7	29.333	352.000
1	1	8	10.417	125.000
1	1	9	10.833	130.000
1	1	10	18.833	226.000
1	1	11	29.917	359.000
1	1	12	11.833	142.000

T A B L A D E P R O M E D I O S
(Continuación)

1	2	1	48.083	577.000
1	2	2	23.417	281.000
1	2	3	5.000	60.000
1	2	4	0.000	0.000
1	2	5	0.167	2.000
1	2	6	0.583	7.000
1	2	7	22.667	272.000
1	2	8	29.000	348.000
1	2	9	31.083	373.000
1	2	10	63.083	757.000
1	2	11	32.750	393.000
1	2	12	25.167	302.000

Valor K	1	2	4
Factor	1	2	3
De	1	1	1
A	12	2	12

T A B L A D E A N Á L I S I S D E V A R I A N Z A
D.C.A. Diseño completamente a azar, factorial de 2 factores

Código	Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F
2	A	1	1096.68	1096.681	0.59
4	B	11	99267.90	9024.355	4.84
6	AB	11	30007.07	2727.915	1.46
-7	Error	264	492466.00	1865.402	

Coefficiente de variación= 201.21%

PRUEBAS DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE DUNCAN Y TUKEY

Cuadrado medio del error = 1865.402
 Grados de libertad del error = 264
 Número de observaciones utilizadas
 para calcular un promedio = 24

$sx = 8.816183$ a $\alpha = 0.05$

PRUEBA DE DUNCAN

Valor DMS = 24.54931 Variable dependiente número 4

Orden original		Orden arreglado	
Prom. 1=	69.67 A	Prom. 1=	69.67 A
Prom. 2=	15.25 BCD	Prom. 10=	40.96 B
Prom. 3=	6.71 CD	Prom. 11=	31.33 BC
Prom. 4=	1.29 D	Prom. 7=	26.00 BCD
Prom. 5=	4.42 CD	Prom. 9=	20.96 BCD
Prom. 6=	2.79 CD	Prom. 8=	19.71 BCD
Prom. 7=	26.00 BCD	Prom. 12=	18.50 BCD
Prom. 8=	19.71 BCD	Prom. 2=	15.25 BCD
Prom. 9=	20.96 BCD	Prom. 3=	6.71 CD
Prom. 10=	40.96 B	Prom. 5=	4.42 CD
Prom. 11=	31.33 BC	Prom. 6=	2.79 CD
Prom. 12=	18.50 BCD	Prom. 4=	1.29 D

PRUEBA DE TUKEY

Orden original		Orden arreglado	
Prom. 1=	69.67 A	Prom. 1=	69.67 A
Prom. 2=	15.25 B	Prom. 10=	40.96 AB
Prom. 3=	6.71 B	Prom. 11=	31.33 AB
Prom. 4=	1.29 B	Prom. 7=	26.00 B
Prom. 5=	4.42 B	Prom. 9=	20.96 B
Prom. 6=	2.79 B	Prom. 8=	19.71 B
Prom. 7=	26.00 B	Prom. 12=	18.50 B
Prom. 8=	19.71 B	Prom. 2=	15.25 B
Prom. 9=	20.96 B	Prom. 3=	6.71 B
Prom. 10=	40.96 AB	Prom. 5=	4.42 B
Prom. 11=	31.33 AB	Prom. 6=	2.79 B
Prom. 12=	18.50 B	Prom. 4=	1.29 B