

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO Y MICROINJERTO DE EXPLANTES
DE CÍTRICOS CERTIFICADOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA
PARA EL NORESTE DE MÉXICO**

PRESENTA

FÉLIX VARELA GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

MAYO 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO Y MICROINJERTO DE EXPLANTES
DE CÍTRICOS CERTIFICADOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA
PARA EL NORESTE DE MÉXICO**

PRESENTA

FÉLIX VARELA GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN

MAYO 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO Y MICROINJERTO DE EXPLANTES
DE CÍTRICOS CERTIFICADOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA
PARA EL NORESTE DE MÉXICO**

PRESENTA

FÉLIX VARELA GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN.

MAYO DE 2015

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías
Asesor Principal

Dr. Emilio Olivares Sáenz
co-Asesor

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
co-Asesor

Dra. María Teresa González Arnao
Asesor Externo

Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Para mi abuela la Sra. María Gloria Martínez Guevara (QPD), matriarca de la Familia Varela Martínez, muchas gracias por su gran amor, por confiar en mí y estar presente en mis recuerdos.

Para mis padres, por creer en mí, por darme la educación recibida en casa, la cual me ayudo para poder llegar a ser un profesionista y ahora haber obtenido un grado más, gracias por apoyarme en este arduo camino que sin su ayuda me hubiera sido muy difícil recorrerlo y poder llegar a la meta trazada, este logro es para ustedes.

Para mis hermanas la Lic. Ma. del Perpetuó Socorro y Lic. Silvia Crystel, gracias por su amor, apoyo, comprensión y sobre todo estar con migo en todos momentos.

Para mi tío Narcizo Varela Martínez, Familia Varela Puga y Chapa Varela.

Para mi tío Sóstenes Varela Martínez (QPD), por esas últimas palabras y creer en mí.

Para mis tíos, que siempre mostraron interés durante el proceso de formación, que se preocuparon por saber de los avances del trabajo de investigación, así como de mi persona, gracias por esas llamadas que siempre fueron muy reconfortantes y recordarme que me esperan en casa.

Para todos los integrantes de las Familias Varela y González por los comentarios positivos que tuvieron hacia mí, muchas gracias por esos detalles.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma del Carmen Ojeda Zacarías, por aceptarme, confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Unidad Marín, gracias por creer en este proyecto.

Para el Dr. Emilio Olivares Sáenz, muchas gracias por su disposición de ayuda en las cuestiones estadísticas, gracias por la atención que siempre mostro para un servidor en resolver dudas de esta ciencia formal tan interesante que es la estadística, de la cual hay demasiado por aprender.

A la Dra. Adriana Gutiérrez Diez, por ser parte de mi comité de tesis y por la revisión del escrito los cuales fueron muy acertados y valiosos para la culminación del presente trabajo de investigación.

Muchas gracias Dra. María Teresa González Arnao, por darme la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo, muchas gracias por su ayuda que mediante consejos la estancia académica fue fundamental en mi formación profesional.

Para la Maestra Alba Rosa Ríos Cruz, gracias por su amistad, consejos y ayuda en la realización de la segunda etapa de investigación, durante el periodo de estancia en la Universidad Veracruzana.

Para el Maestro José Argelio Santos Haliscak, por su ayuda en la revisión del abstract de la investigación.

Para la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Para todo su personal académico que con su ayuda y consejos pude llegar alcanzar mi objetivo.

Para el Dr. Guillermo Cristian Guadalupe Martínez Ávila, (profesor de la materia de seminario) por sus valiosos consejos desde que llegue a la Facultad de Agronomía.

Para mi gran amigo Dr. Edward Alexander Espinosa Sánchez, por los consejos recibidos para mi persona, así como para el trabajo de investigación que sin duda me ayudaron en el proceso de formación, gracias por esa amistad.

Para mis amigos de la Maestría en Ciencias en Producción Agrícola, con los que pase muy buenos momentos, grandes experiencias de las cuales me llevo muy demasiadas anécdotas, gracias por todo esperando en algún momento de la vida

profesional poder colaborar con ustedes; Ivon M. Cerda Hurtado, Francisco Ayala Moreno, Pablo Alan Salinas Rodríguez, Marcos Manuel Quintero González, Iván L. Pequeño Granado, Fernando Villela Méndez, Eleazar Lugo Moreno, José Escoto, Zhaid Meza Carranco.

Para mis compañeros de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Unidad Marín de donde llevo muy buenos recuerdos; gracias Nimbe, Elisa, Nara, Nora, Alejandro, Jaime, Paul, Néstor.

Para mis amigos que conforman el gran equipo de trabajo del Laboratorio de Criobiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Veracruzana; MC. Fabiola, MC. Oscar (cuasi Doctores), IBT Heydi, Alejandra, Ana, Rosa, Adelma, Sararí, Sugey, Jazzmin, para Tania, Eli y Mariel muchas gracias niñas por recibirme en su Facultad y todos esos buenos momentos. Para Daniel fiel escudero en las salidas a campo, por acompañarme y ser guía de la zona citrícola Cuitláhuac Veracruz.

Para los profesores investigadores de la Universidad Veracruzana los cuales mostraron interés mediante sus preguntas y consejos en los seminarios impartidos, así como ayuda en el laboratorio durante mi estancia académica Dr. Carlos Cruz Cruz, Dra. Paola, MC Marisol Castillo, MC Alexandre.

Para Doña Liz, técnico del Laboratorio de Criobiología y Biotecnología Vegetal, la cual siempre mostro interés en la investigación, ayuda así como amistad incondicional durante mi estancia en la UV, gracias por formar parte en esa etapa de mi formación.

Para mis compañeras del Laboratorio y de la Maestría en Ciencias en Procesos Biológicos de la Universidad Veracruzana; Quetzali, Eunice, Adriana y Fabiana.

Para mis amigos de la segunda generación de la M.C. de la U.V., MC. Fabiola, MC. Manuel, MC. José Luis y MC. Francisco.

Para mis amigos y compañeros de la tercer y cuarta generación de la MC. de la UV, gracias por hacer mi estancia académica muy agradable.

Para mis amigos Ivonne y Ariel, por su ayuda, consejos y amistad brindada, gracias por ser de las personas que hicieron mi estancia en Nuevo León más fácil mediante su apoyo incondicional.

Para mis amigos Irving Michel López y Cristian, compañeros foráneos con los que forme una buena amistad, teniendo metas y objetivos en común.

Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Mi agradecimiento para el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca de estudios de posgrado.

Mi más profundo agradecimiento para la Universidad Autónoma de Nuevo León, por recibirme en sus instalaciones y formarme una vez más profesionalmente.

Al Dr. José Roberto Campos Leal, por confiar en un servidor, por esos buenos consejos que oportunamente cambiaron mi vida académica. Muchas gracias Dr. objetivo realizado.

Al Ing. Juan José Rodríguez Flores, presidente del Campo Experimental General Francisco Villa.

Al Ing. Alberto Villarreal Moncada, gerente del Campo Experimental General Francisco Villa, por su valiosa ayuda mediante consejos y donaciones de material vegetal con el cual se realizó la presente investigación.

Para el Dr. Sóstenes Edmundo Varela Fuentes, por involuntariamente encaminarme en el estudio de los cítricos, observando la pasión con la cual realiza su trabajo de investigación y académico. Muchas gracias tío, por darme la oportunidad de ser su alumno.

CONTENIDO

| | |
|--|----------|
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTOS | vi |
| AGRADECIMIENTOS ESPECIALES | viii |
| ÍNDICE DE CUADROS | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiii |
| RESUMEN | xiv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. HIPÓTESIS | 6 |
| 1.2. OBJETIVO GENERAL..... | 7 |
| 1.2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 7 |
| 2. REVISION DE LITERATURA | 8 |
| 2.1. Origen y Generalidades de los Cítricos..... | 8 |
| 2.2. Importancia y Distribución de los Cítricos..... | 9 |
| 2.3. Producción Citrícola a Nivel Mundial..... | 9 |
| 2.3.1. Producción de limón (<i>Citrus aurantifolia</i>) a nivel mundial | 10 |
| 2.3.2. Producción mundial de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)..... | 11 |
| 2.4. Producción Citrícola Nacional | 12 |
| 2.4.1. Producción nacional de limón (<i>Citrus aurantifolia</i>)..... | 13 |
| 2.4.2. Producción nacional de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) | 14 |
| 2.5. Regiones Citrícolas en México | 15 |
| 2.6. Producción Regional Citrícola en el Noreste de México..... | 16 |
| 2.6.1. Producción citrícola en Tamaulipas | 16 |
| 2.6.2. Producción citrícola en Nuevo León | 16 |
| 2.7. Producción Regional de Limón (<i>Citrus aurantifolia</i>) | 17 |
| 2.7.1. Principales municipios productores de limón en el estado de Veracruz, México | 17 |
| 2.7.2. Producción regional de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)..... | 18 |
| 2.8. Principal Factor que está Afectando la Producción Citrícola en México..... | 19 |
| 2.9. Morfología de <i>Diaphorina citri</i> K | 20 |
| 2.9.1. Clasificación taxonómica del psílido asiático de los cítricos (<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama)..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 2.10. Plantas Hospederas de <i>Diaphorina citri</i> K..... | 21 |
| 2.11. Distribución Geográfica en el Continente Americano de <i>Diaphorina citri</i> | 21 |
| 2.12. Presencia de <i>Candidatus liberibacter</i> en las Plantaciones Citrícolas en México | 22 |
| 2.13. Síntomas Característicos de Huanglongbing de los Cítricos..... | 23 |
| 2.14. Medidas fitosanitarias implementadas para el control de <i>C. liberibacter</i> | 23 |
| 2.15. Impacto de la Biotecnología Vegetal | 24 |
| 2.16. La Importancia del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) | 25 |
| 2.16.1. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales | 25 |
| 2.17. Etapas de la Micropropagación | 26 |
| 2.17.1. Etapa 0: Selección y preparación de la planta madre..... | 26 |
| 2.17.2. Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico..... | 26 |
| 2.17.3. Etapa II: Proliferación de brotes..... | 27 |
| 2.17.4. Etapa III: Enraizamiento..... | 27 |
| 2.18. Ventajas y Desventajas de la Micropropagación..... | 28 |
| 2.19. Técnicas de Conservación <i>in vitro</i> a Corto y Mediano Plazo..... | 29 |
| 2.20. Propagación <i>In Vitro</i> en Cítricos..... | 30 |
| 2.21. Técnica Utilizada para el Saneamiento de Brotes..... | 36 |
| 2.21.1. Técnica de microinjerto de ápices caulinares <i>in vitro</i> | 36 |
| 2.21.2. Microinjerto en cítricos | 37 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 40 |
| 3.1. Localización del Experimento..... | 40 |
| 3.2. Material Vegetal | 40 |
| 3.2.1. Recolectas del material vegetal | 41 |
| 3.3. Condiciones de Traslado a Laboratorio..... | 42 |
| 3.4. Preparación de los Medios de Cultivo para el Establecimiento <i>in vitro</i> | 43 |
| 3.5. Proceso de Desinfección del Material Vegetal | 44 |
| 3.6. Establecimiento Aséptico de los Explantes | 46 |
| 3.7. Etapa de Inducción de Meristemos Asépticos..... | 48 |
| 3.8. Material Vegetal para el Microinjerto | 49 |
| 3.8.1. Obtención del material de cítricos certificados..... | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9. Obtención de Frutos de los Campos Certificados | 49 |
| 3.9.1. Disección y extracción de semillas de los frutos | 50 |
| 3.9.2. Desinfección y siembra <i>in vitro</i> de portainjertos de cítricos | 51 |
| 3.10. Acondicionamiento de las Plantas Donadoras | 51 |
| 3.10.1. Recolección de los brotes de cítricos..... | 51 |
| 3.10.2. Establecimiento aséptico de brotes | 52 |
| 3.11. Microinjerto de Ápices Caulinares de Cítricos | 53 |
| 3.12. Análisis Estadístico | 54 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 55 |
| 4.1. Proceso de desinfección del material vegetal | 55 |
| 4.2. Establecimiento Aséptico de Meristemas | 59 |
| 4.3. Inducción de Brotes a Partir de Meristemas..... | 62 |
| 4.4. Evaluación de la Técnica del Microinjerto | 67 |
| 5. CONCLUSIONES | 70 |
| 6. RECOMENDACIONES | 71 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 72 |
| ANEXOS | 79 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Pág. |
|--------|---|------|
| 1 | Producción Mundial de Cítricos..... | 10 |
| 2 | Principales países productores de limón..... | 10 |
| 3 | Principales países productores de naranja dulce en rendimiento por t/ha de 1995 a 2005..... | 12 |
| 4 | Producción Estatal de Cítricos..... | 13 |
| 5 | Principales estados productores de limón en México..... | 14 |
| 6 | Principales estados productores de naranja dulce..... | 14 |
| 7 | Producción Citrícola Regional en Tamaulipas..... | 16 |
| 8 | Producción Regional en Nuevo León..... | 17 |
| 9 | Principales municipios del Estado de Veracruz productores de limón..... | 17 |
| 10 | Producción Regional de naranja dulce en el estado de Veracruz..... | 18 |
| 11 | Detección del HLB en México..... | 22 |
| 12 | Cultivares de cítricos provenientes del Banco de germoplasma del Campo Experimental General Francisco Villa..... | 41 |
| 13 | Componentes inorgánicos de los medios de cultivo MS y DCR..... | 43 |
| 14 | Componentes orgánicos de los medios MS y DCR..... | 44 |
| 15 | Tratamientos de desinfección para yemas axilares y meristemas..... | 46 |
| 16 | Establecimiento de tratamientos en los medios de cultivo MS y DCR..... | 48 |
| 17 | Porcentaje de ápices no viables de los portainjertos de cítricos (<i>C. volkameriana</i> y <i>C. troyer</i>), durante dieciocho días..... | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Pág. |
|---------------|---|-------------|
| 1 | Principales regiones productores de cítricos..... | 15 |
| 2 | Producción de limón en 11 años en el estado de Veracruz..... | 18 |
| 3 | Producción de naranja dulce en 11 años en el estado de Veracruz..... | 19 |
| 4 | A) Lote productor de yemas, B) Varetas de 35 cultivares de cítricos... | 42 |
| 5 | A) Condiciones de traslado. B) Lavado de material vegetal en Laboratorio..... | 43 |
| 6 | A) Pre-desinfección para yemas axilares. B) Pre-desinfección para meristemos..... | 45 |
| 7 | Establecimiento aséptico de yemas axilares..... | 46 |
| 8 | Establecimiento aséptico de meristemos..... | 47 |
| 9 | A) Lote Productor de semillas. B) Recolecta de portainjertos..... | 50 |
| 10 | Disección de frutos y extracción de semillas..... | 50 |
| 11 | Estructura para monitoreo <i>D. citri</i> y obtención de brotes..... | 52 |
| 12 | Proceso de desinfección de brotes de cítricos..... | 53 |
| 13 | A) Disección de vitroplanta. B) Microinjerto de ápice caulinar de cítrico..... | 54 |
| 14 | B1) Contaminación por hongos y B2) por bacterias..... | 55 |
| 15 | Inicio de contaminación por bacterias..... | 60 |
| 16 | Respuesta <i>in vitro</i> de meristemos de 35 cultivares de cítricos..... | 61 |
| 17 | Crecimiento de meristemos..... | 64 |
| 18 | Tratamientos evaluados en medios de cultivos MS y DCR de 35 cultivares de cítricos..... | 66 |

RESUMEN

Huanglongbing (HLB) de los cítricos o Greening, ha ocasionado pérdidas en la producción citrícola nacional desde su presencia como enfermedad en el año 2009. *Candidatus liberibacter (americanus)* bacteria gram-negativa transmitida por psíidos (*Diaphorina citri*) infectivos ocasiona la muerte de los árboles en un lapso de 3 a 10 años. Pese a las medidas fitosanitarias implementadas en México de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-047-FITO-2009), *C. liberibacter* sigue diseminándose en las plantaciones citrícolas. Para el mes de agosto del 2014 el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), reportó la presencia de la bacteria en 16 de los 23 estados productores de cítricos. Los principales estados productores de cítricos Veracruz, Tamaulipas y Nuevo León, aún no reportan HLB en sus plantaciones. Las nuevas plantaciones citrícolas requieren de material vegetal certificado y propagado bajo condiciones de sanidad vegetal, que ayuden a mitigar la enfermedad o que prolongue la vida productiva del árbol. La Biotecnología Vegetal ofrece técnicas de conservación de recursos fitogenéticos, utilizando la preservación *in vitro*, resguardando el material vegetal susceptible a plagas y enfermedades e incluso a las condiciones ambientales desfavorables. La técnica del microinjerto es utilizada para el saneamiento de brotes

y rejuvenecimiento de material vegetal. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue establecer asépticamente meristemas y microestacas e identificar la técnica de desinfección de 35 cultivares de cítricos y evaluar dos medios de cultivo (MS y DCR) para la inducción de brotes y utilizar la técnica de microinjerto para la regeneración de ápices caulinares. Las concentraciones que ayudaron a erradicar la contaminación de los explantes fueron del 10 al 30 % de NaClO durante 15 minutos en condiciones asépticas. El explante con el que se logró el establecimiento aséptico fue el meristemo de los 35 cultivares de cítricos. No se encontró diferencias significativas entre los medios de cultivo MS y DCR con respecto a la inducción de brotes. El portainjerto que proporcionó mayor viabilidad fue el *C. troyer*, con porcentajes de mortalidad de 33.33 en comparación con *C. volkameriana* el cual alcanzó porcentajes del 53.33.

Palabras claves: ápice, meristemo, in vitro, portainjerto.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) or Citrus Greening, has caused losses in the national citrus production since the year 2009. *Candidatus liberibacter* (americanus) a gram-negative bacteria transmitted by infective psyllids (*Diaphorina citri*) causes death of trees in a span of 3 to 10 years. Despite phytosanitary measures implemented in Mexico according to the Official Mexican Norm (NOM-EM-047-FITO-2009), *C. liberibacter* is still spreading in citrus plantations. In August 2014, the Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) reported the presence of bacteria in 16 of the 23 citrus producing states. Veracruz, Tamaulipas and Nuevo Leon, the main citrus producing states, have not yet reported HLB on their plantations. The new citrus plantations require certified plant material and propagation under plant health conditions, to help mitigate the disease or prolong the productive life of trees. Plant Biotechnology offers techniques to conserve plant genetic resources, using the *in vitro* preservation, protecting the plant material susceptible to pests and diseases and even to unfavorable environmental conditions. Micrografting technique is used to renovate and preserve plant material. So the objective of this research was to establish aseptic meristems and microcuttings, also to identify the disinfection technique for 35 citrus cultivars and evaluate two culture media (MS and DCR) for shoot induction, micrografting was used for regeneration of shoot tip. Results showed

that the concentrations of NaClO that helped to eliminate contamination of the explants were from 10 to 30 % for 15 minutes in aseptic conditions. The explants with the aseptic establishment were the meristem of the 35 cultivars of citrus. No significant difference between MS culture media and DCR over shoot induction was found. The rootstock which provided greater viability was *C. troyer* with mortality rates of 33.33 compared to *C. volkameriana* which reached a percentage of 53.33.

Keywords: *apex, meristem, in vitro, rootstock*

1. INTRODUCCIÓN

México se posiciona en el quinto lugar de producción de cítricos a nivel mundial con el 4.6 %, China es el principal productor con el 21 %, Brasil aporta el 18 % de la producción mundial, seguido de Estados Unidos aportando el 8 % e India con el 6 % (SAGARPA, 2012).

La producción citrícola en México es una actividad de importancia económica y social. Esta actividad se realiza en regiones de clima tropical y sub-tropical, en un poco más de medio millón de hectáreas destinadas para este cultivo, distribuidas en 23 estados de la República Mexicana, obteniendo alrededor de 6,346,964 millones de toneladas (SAGARPA, 2012).

El 80 % de la superficie cultivada está destinada para cítricos dulces, con una producción aproximada de 4.6 millones de toneladas por cosecha, principalmente naranja (83 %), toronja (8 %), mandarina (5 %) y tangerinas (4 %). La citricultura representa una fuente importante de ingresos económicos para la zona rural, estimándose que alrededor de 69 mil familias dependen de esta actividad, generando alrededor de 7,100, 000 millones de pesos. La mayor producción nacional se localiza

en tan solo cinco estados, Veracruz con el 55 %, San Luis Potosí y Tamaulipas, que en conjunto suman el 22 %, así como Puebla y Nuevo León (SAGARPA, 2012).

En la actualidad, el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) es una plaga de gran importancia que ocasiona daños al succionar la savia de la planta induciendo malformaciones en las partes afectadas, sin embargo el daño más grave es el indirecto debido a que es vector del Huanglongbing o (HLB), enfermedad considerada devastadora a nivel mundial, causada por la bacteria *Candidatus liberibacter* que empieza reduciendo la calidad de la fruta y termina con la muerte gradual de la planta (Sánchez, 2010).

Candidatus liberibacter desde su presencia en México en el año 2009, ha ocasionado la pérdida de plantaciones cítricas debido a que ocasiona la muerte de los árboles en lapsos de 3 a 10 años; una de las medidas fitosanitarias implementadas para su control es la erradicación de los árboles detectados como positivos de la presencia de la bacteria en un lapso no mayor a 5 días NOM-EM-047-FITO (2009). Su presencia ha avanzado y sigue detectándose la enfermedad en huertos comerciales. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), para el mes de Agosto del 2014 reportó la presencia de la bacteria, en 16 estados productores de cítricos (SENASICA, 2014).

La conservación de los recursos fitogenéticos, utilizando técnicas de *in vitro*, ya sea para fines de conservación, mejoramiento genético, investigación o como seguridad alimenticia, ayuda a resguardar el material vegetal susceptible a plagas o enfermedades e incluso a las condiciones ambientales desfavorables (Sánchez,

2010). La conservación *in vitro* consiste en preservar en medios de cultivo químicamente definidos y en condiciones ambientales controladas en laboratorio explantes de plantas involucrando ciertas técnicas de establecimiento y almacenamiento; el uso de esta tecnología permite utilizar cualquier parte de la planta desde semillas, embriones, cotiledones, tallos, hojas, ápices, secciones internodales, polen, dependiendo de cada especie (Tyagi *et al.*, 2007).

Los bancos de germoplasma *in vitro* ofrecen al propagador, productor o mejorador, una gran diversidad genética para desarrollar nuevos cultivares o híbridos, obteniendo mejores características de fruto, estructura de planta, resistencia o tolerancia a patógenos, incluso tolerancia a condiciones ambientales desfavorables (Keller *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas, en las cuales se puede utilizar cualquier parte de la planta ya sean tejidos u órganos, en medios de cultivo específicos químicamente definidos, en condiciones controladas *in vitro* y por consecuencia libres de microorganismos (Calva y Ríos, 1999). La técnica de micropropagación está basada en el principio de totipotencia, en donde se establece que una sola célula vegetal contiene el mismo material genético de la planta de la que proviene sin influir de donde proviene o de la función de la misma, por lo tanto tiene la capacidad de regenerar a partir de esa célula una planta completa (Fert y Paul, 2000). Esta técnica consiste en cuatro etapas, etapa 0: Selección y preparación de la planta madre; etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico; etapa II: Proliferación de brotes; etapa III: Enraizamiento y etapa IV: Aclimatación. Las

primeras etapas son importantes para el éxito en el establecimiento aséptico del material vegetal de interés, ya que la etapa 0 consiste en la selección del material tomando en cuenta la sanidad vegetal de la planta madre y de las características que el propagador requiera, en la etapa 1 se hace uso de diferentes compuestos químicos como el etanol, hipoclorito de sodio (NaOCl), hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), cloruro de mercurio (HgCl_2), entre otros, en diferentes tiempos y concentraciones hasta que garanticen la asepsia del explante, es importante utilizar la concentración y el tiempo de exposición adecuada a las soluciones de desinfección del material vegetal para la erradicación de microorganismos superficiales que pueda tener el explante seleccionado en campo, logrando así su establecimiento aséptico. Para el establecimiento aséptico correspondiente a la etapa uno, es necesario encontrar la solución desinfectante del explante así como los tiempos y las concentraciones adecuadas que no le ocasionen daños al material vegetal. Para la etapa 2, se requiere la presencia de fitohormonas para inducir la formación de brotes, elongación celular así como la multiplicación de brotes a través de varios subcultivos transfiriendo los materiales a medios nuevos. La etapa 3, consiste en la inducción de la rizogénesis, es importante mencionar que algunos explantes al realizarse los subcultivos llegan a formar raíces, dependiendo de la capacidad de regeneración del explante y de factores internos, externos que estén íntimamente relacionados con la regeneración de la especie. La etapa 4 consiste en la aclimatación de las plántulas micropropagadas, la cual inicia en ir bajando la humedad relativa a las plántulas hasta llegar a condiciones normales de invernadero, para poder ser transferidas con éxito en campo (Hartmann y Kester, 1999).

El uso de la técnica del microinjerto de ápices caulinares en cítricos, ha demostrado ser el método más adecuado para el saneamiento de brotes, obteniendo así material vegetal libre de virus y viroides, es decir con características de certificación debido a que con esta técnica se pueden eliminar fitopatógenos que por otras técnicas de saneamiento no son tan eficaces; esta técnica ha demostrado ser superior en cuanto a la eliminación de microorganismos dañinos, garantizando la sanidad vegetal, constituyendo así las bases de los programas de mejoramiento sanitario en países con gran desarrollo citrícola (Navarro, 1979). Por lo antes mencionado, los objetivos de esta investigación establecer asépticamente meristemas y microestacas identificando la técnica de desinfección de 35 cultivares de cítricos, y utilizando la técnica de microinjerto, para la regeneración de ápices caulinares.

1.1. HIPÓTESIS

1. La concentración y tiempo de exposición del material vegetal, en el agente desinfectante garantizará la eliminación de microorganismos superficiales, causantes de contaminación *in vitro* del material seleccionado en condiciones de invernadero.
2. Los medios de cultivo MS y DCR así como reguladores de crecimiento permitirán la inducción de brotes *in vitro* en cítricos.
3. La técnica del microinjerto permitirá la regeneración de los tejidos caulinares de cítricos.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Establecer asépticamente meristemas y microestacas e identificar la técnica de desinfección de 35 cultivares de cítricos y evaluar dos medios de cultivo (MS y DCR) para la inducción de brotes y utilizar la técnica de microinjerto para la regeneración de ápices caulinares.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el agente desinfectante, dosis y tiempo de exposición del material vegetal.
2. Identificar el medio de cultivo y dosis óptima de los reguladores de crecimiento en la etapa de establecimiento e inducción *in vitro*.
3. Definir la técnica del microinjerto que garantice la regeneración de los ápices caulinares en cítricos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Origen y Generalidades de los Cítricos

Los cítricos pertenecen al orden de las Geraniales, a la familia de las Rutáceas, subfamilia Aurantioideae, tribu Citrae y subtribu Citrinae. Las especies comerciales de cítricos usadas como injerto o portainjerto pertenecen al género *Citrus*, a excepción de los *Fortunella spp.* (kumquats) y naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*). La mayoría de los cítricos son especies nativas de las regiones tropicales y subtropicales del sur este de Asia y del archipiélago Malayo (Varela *et al.*, 2013).

Los cítricos son un cultivo de las regiones subtropicales, los cuales presentan adaptabilidad a las condiciones ambientales de zonas tropicales, encontrándose que al aumento de la temperatura, el color de la cáscara así como la calidad interna de la fruta es diferente a las establecidas en zonas subtropicales, dificultando la exportación para algunos países. Para el caso de toronja y lima ácida se obtiene mejor calidad en zonas tropicales (Ordúz-Rodríguez y Mateus-Cagua, 2012).

Las especies de cítricos de mayor importancia económica a nivel mundial son naranja (*Citrus sinensis* (L) Osbeck), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), toronja (*Citrus paradisi* Macf.), limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle), limón

italiano o verdadero (*Citrus limón* (L) Burm. F.) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka). Estas frutas son de importante valor nutritivo, debido al equilibrio entre sus contenidos de agua, azúcares, ácidos, sales minerales, vitaminas C, B₁ y B₂, hierro y calcio (Varela *et al.*, 2013).

2.2. Importancia y Distribución de los Cítricos

Se reporta que 140 países en el mundo producen cítricos, dentro de los principales están China, Brasil, Estados Unidos, India, México, España, Turkia, Nigeria y Argentina. Para el año 2011 la producción mundial de cítricos fue de alrededor de 120 millones de toneladas de fruta reportado por la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2011). La naranja es la especie más cosechada y cultivada a nivel mundial generando alrededor de 63.3 millones de toneladas, representando el 52.9 % del total. Brasil aporta el 31.3 % del total de la fruta dulce. La mandarina se posiciona en el segundo lugar como la especie cítrica de mayor importancia con 23.3 millones de toneladas, China produce la mitad del total de esta fruta. Los limones como el limón mexicano y limón persa, incluyendo las limas ácidas, lima dulce y limón verdadero producen 1.9 millones de toneladas; en este cultivar México se posiciona en el primer lugar a nivel mundial con el 16.7 % del total de la producción (FAO, 2012).

2.3. Producción Cítrica a Nivel Mundial

La producción mundial de cítricos está localizada principalmente en diez países productores de cítricos de acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura por sus siglas en inglés FAO (Cuadro 1). Dentro de los

cinco principales países productores a nivel mundial se posiciona Brasil con una cantidad de 18,685 toneladas cuyo valor es 3, 283,702 millones de pesos, seguido por Estados Unidos con 7, 357 toneladas y un valor de 1, 292,919 millones de pesos, en tercer lugar India con una producción de 4266. 9 toneladas con un valor de 685,386 millones de pesos, como cuarto lugar se presenta México con 4, 248,715 toneladas y un valor de 746,669 millones de pesos y como quinto lugar China con una producción de 3, 172. 9 toneladas con un valor de 557,607 millones de pesos. Estos 5 países generan el 64.3 % de la producción total con un valor de 6, 566,283 millones de pesos (FAO, 2012).

Cuadro 1. Producción Mundial de Cítricos

| País | Producción (ton) | Valor (\$ Int 1000) | País | Producción (ton) | Valor (\$ Int 1000) |
|--------|------------------|---------------------|-----------|------------------|---------------------|
| Brasil | 18,685 | 3,283.702 | España | 2740.3 | 456.818 |
| E U A | 7,357 | 1,292.919 | Indonesia | 2625.8 | 461.472 |
| India | 4,266.9 | 685.386 | Irán | 2300 | 404.202 |
| México | 4,548.7 | 746.669 | Italia | 2197.3 | 403.053 |
| China | 3,172.9 | 557.607 | Egipto | 2054.6 | 316.332 |

Fuente: FAO, 2012

2.3.1. Producción de limón (*Citrus aurantifolia*) a nivel mundial

Los principales países productores de limones a nivel mundial son India, México, Argentina, China y Brasil (Cuadro 2). De acuerdo a datos de la (FAO, 2012), estos países produjeron en el año 2010 un total de 8.1 millones de toneladas.

Cuadro 2. Principales Países productores de limón.

| Países | Valor\$/Producción | Producción (Ton) |
|-----------|--------------------|------------------|
| India | 1,228.654 | 3.098,900 |
| México | 749.904 | 1,891,400 |
| Argentina | 441,434 | 1,113,380 |

| | | |
|--------|---------|-----------|
| China | 419,518 | 1,058.105 |
| Brasil | 404,549 | 1.020,350 |
| E.U. | 317,240 | 800.140 |

Fuente: FAO, 2012

México en el 2005 era el principal productor de limón en el mundo, pero en 2006 India desplazó a México y Argentina al segundo y tercer lugar, respectivamente. México se ha mantenido durante estos últimos años en cuanto a volumen de producción.

2.3.2. Producción mundial de naranja (*Citrus sinensis*)

El principal país productor de naranja dulce es Brasil, en segundo lugar tenemos a Estados Unidos, seguidos de India, México y China. En el Cuadro 3 se muestra el rendimiento por hectárea de los principales países productores de naranja desde el año 1995 al 2005. México por su parte ha tenido un comportamiento más dinámico con una Tasa Media de Crecimiento Anual (TMCA) del 1.9 %, lo cual se explica con la incorporación de nuevas plantaciones de este cultivo. En cuanto al volumen de producción, Brasil sigue siendo el principal productor con una producción promedio de 19 millones de toneladas, lo que representa un 32 % del volumen producido. México presenta un comportamiento estable en cuanto a rendimientos, sin embargo aún se encuentra por debajo del promedio mundial. El país que tiene mejores rendimiento (por arriba de 30 toneladas por hectárea) es Estados Unidos, seguido de Turquía (SIAP, 2011).

Cuadro 3. Principales países productores de naranja dulce en rendimiento por t/ha de 1995 a 2005.

| País | Años | | | | | | | | | | | Prom. |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | |
| China | 7.2 | 7.2 | 6.7 | 4.9 | 5.2 | 4.6 | 5.7 | 5.8 | 6.7 | 7.5 | 7.5 | 6.3 |
| Mex | 13.1 | 12.7 | 12.8 | 10.9 | 11.3 | 11.8 | 12.3 | 11.9 | 12.0 | 12.0 | 12.0 | 12.1 |
| Bra | 23.2 | 21.9 | 23.4 | 20.5 | 22.3 | 24.9 | 20.6 | 22.4 | 20.2 | 22.0 | 22.0 | 22.1 |
| Esp | 19.3 | 16.4 | 21.0 | 17.8 | 19.9 | 19.4 | 21.0 | 24.4 | 22.3 | 22.4 | 22.4 | 20.6 |
| Ind | 17.3 | 19.2 | 19.6 | 21.5 | 23.1 | 23.1 | 22.0 | 23.3 | 22.9 | 23.1 | 23.1 | 21.7 |
| Ita | 14.7 | 16.0 | 16.7 | 12.0 | 16.3 | 17.6 | 17.5 | 15.8 | 16.2 | 24.3 | 24.3 | 17.0 |
| EU | 33.2 | 31.7 | 33.7 | 37.0 | 26.5 | 35.8 | 33.6 | 34.9 | 32.6 | 27.6 | 27.6 | 32.9 |

2.4. Producción Citrícola Nacional

México ocupa el quinto lugar en la producción mundial de cítricos con 6.9 millones de toneladas, segundo lugar en producción de limón con 1.9 millones de toneladas, tercer lugar como productor de toronja con 0.4 millones de toneladas y décimo tercer lugar como generador de mandarinas y tangerinas con 0.5 millones de toneladas, cuenta con una superficie plantada de 553,000 hectáreas, distribuidas en 23 estados de la República, su producción, procesamiento e industrialización generan 70,000 mil empleos directos y 250,000 indirectos, dependiendo de esta actividad cerca de 67,000 familias (SIAP, 2012).

El principal estado productor de cítricos es Veracruz, donde se cultiva naranja, limón, mandarina, toronja, tangerina y tangelo. En segundo lugar está Tamaulipas con producción de naranja, mandarina y toronja. El tercer lugar lo ocupa San Luis Potosí con naranja y mandarina. En el cuarto lugar se ubica Nuevo León con naranja, mandarina y toronja y en el quinto está Michoacán con limón y toronja (Cuadro 4). Los frutos cítricos se destinan primordialmente al mercado doméstico. Del total de la producción nacional, el 88 % se dirige al consumo interno y para la exportación el 12

%, de los cuales se conforma como jugos el 1.4 % y como fruta fresca el 0.44% (SIAP, 2012).

Cuadro 4. Producción Estatal de Cítricos.

| Estado | S./cosechada (Ton) | Producción (Ton) | Valor\$/Producción |
|-----------------|--------------------|------------------|--------------------|
| Veracruz | 160,671.50 | 1,982,951 | 2,435,842 |
| Tamaulipas | 32,784.78 | 544,922.40 | 1,182,221 |
| San Luis Potosí | 37,415.50 | 374,480.65 | 513,260.9 |
| Nuevo León | 24,951.98 | 271,954.56 | 309,830.8 |
| Puebla | 22,826.00 | 258,694.00 | 372,965.6 |
| Colima | 402.20 | 5,537.50 | 16,256.78 |
| Michoacán | 307.37 | 3,381.48 | 7,009.18 |

Fuente: SIAP, 2011

2.4.1. Producción nacional de limón (*Citrus aurantifolia*)

El limón mexicano se cultiva principalmente en seis estados y ocupa una superficie de 153,442.62 hectáreas, con una producción promedio anual de 1.89 millones de toneladas. En la producción anual exportable generalmente han participado tres estados: Veracruz, Michoacán y Colima. La producción de limón en México, está prácticamente dividida por zona geográfica, ya que el Limón Persa se produce principalmente en los estados costeros del Golfo de México, mientras que el limón Mexicano (o limón Agrio) se produce en los estados del litoral del Pacífico (SENASICA, 2011).

El principal estado productor de limón es Veracruz, cuenta con una superficie de 37,864.27 ha, arrojando valores de producción de 1,528,819.04 de pesos para el año 2011, le sigue el estado de Michoacán generando ingresos de 1,461,033.46 de pesos en el tercer lugar se encuentra el estado de Colima con 21,358.73 ha e ingresos de producción de 1,421,284.82 (SIAP, 2011) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Principales estados productores de limón en México.

| Estado | S./cosechada | Prod./ton. | Valor\$/Prod. |
|-----------|--------------|------------|---------------|
| Colima | 21,358.73 | 493,685.86 | 1,421,284.82 |
| Guerrero | 6,873.75 | 70,660.31 | 178,728.38 |
| Jalisco | 4,717.59 | 36,697.55 | 184,185.08 |
| Michoacán | 42,475.66 | 463,396.94 | 1,461,033.46 |
| Oaxaca | 24,375.72 | 208,077.46 | 778,979.45 |
| Veracruz | 37,864.27 | 519,914.99 | 1,528,819.04 |

Fuente: SIAP 2011

2.4.2. Producción nacional de naranja (*Citrus sinensis*)

En el Cuadro 6 se muestran los principales estados productores de naranja dulce en la República Mexicana, Veracruz cuenta con una superficie de 160,888.80 ha destinadas para el cultivo de naranja dulce, y obtuvo ingresos económicos de 2,435,84.72 pesos en el 2011. San Luis Potosí tiene 38, 273.50 ha, Tamaulipas es el tercer estado productor de naranja dulce y cuenta con una superficie de 33, 938.00 ha, con una producción de 544,922.40 toneladas y con ingresos de 1,182,221.45. El estado de Nuevo León se encuentra en el quinto lugar, cuenta con una superficie de 25,445.98 ha, con una producción de 271,954.56 toneladas y con ingresos por esta actividad de 309,830.82 pesos (SIAP, 2012).

Cuadro 6. Principales estados productores de naranja dulce.

| Estado | Sup./cosecha | Prod./Ton. | Valor\$/Prod. |
|-----------------|--------------|--------------|---------------|
| Veracruz | 160,888.80 | 1,982,951.78 | 2,435,842.72 |
| Tamaulipas | 33,938.00 | 544,922.40 | 1,182,221.45 |
| San Luis Potosí | 38,273.50 | 374,480.65 | 513,260.95 |
| Puebla | 22,826.00 | 258,694.00 | 372,965.67 |
| Nuevo León | 25,445.98 | 271,954.56 | 309,830.82 |

Fuente: SIAP 2011

2.5. Regiones Citrícolas en México

Las principales regiones cítricas en México (Figura 1), son región del Golfo de México (Veracruz y Tabasco), región noreste (Nuevo León y Tamaulipas), región de las Huastecas (San Luis Potosí, Hidalgo y norte de Veracruz), Península de Yucatán (Yucatán, Quintana Roo y Campeche), vertiente del Pacífico (Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco, Nayarit y Sinaloa) y planicie costera del noroeste (Sonora y Baja California Sur) (Varela *et al.*, 2013).



Figura 1. Principales regiones productoras de cítricos

La geografía productiva se encuentra bien definida, 91 % de la producción total está concentrada en solo 10 estados. Los principales estados productores de cítricos son Veracruz con el 42.6 % de la superficie nacional, Michoacán con el 8.8 %, Tamaulipas con 8.1 %, San Luis Potosí con el 7.7 %, seguido por Nuevo León, Colima, Oaxaca, Tabasco, Puebla, Yucatán (Varela *et al.*, 2013).

2.6. Producción Regional Citrícola en el Noreste de México

2.6.1. Producción citrícola en Tamaulipas

La producción citrícola en el estado de Tamaulipas se sitúa en 22 localidades distribuidas en las diferentes zonas productoras, cuenta con una superficie establecida de 33,938 hectáreas, las localidades con mayor extensión son Güemez con 10,015 ha, Padilla con 7,923.58 ha, Hidalgo con 5,430 ha (Cuadro 7), produciendo ingresos de 1, 182,221.45 pesos (SIAP, 2011).

Cuadro 7. Producción Citrícola Regional en Tamaulipas.

| Municipio | S./cosechada (Ton) | Producción (Ton) | Valor\$/Producción |
|-----------|--------------------|------------------|--------------------|
| Güemez | 10,015.00 | 169,190.00 | 306,331.20 |
| Padilla | 7,247.36 | 144,843.00 | 364,996.04 |
| Hidalgo | 5,220.00 | 83,344.00 | 166,688.00 |

Fuente: SIAP, 2011.

2.6.2. Producción citrícola en Nuevo León

En Nuevo León la producción de cítricos, como naranja, mandarina y toronja se cultivan mayoritariamente en la región centro del estado (más de 350 mil toneladas al año) en especial en los municipios de Montemorelos, General Terán y Cadereyta de Jiménez (Cuadro 8), aquí se producen alrededor del 81 % de la cosecha de estos cultivos a nivel estatal (Ortega-Gaucin, 2011). La producción de cítricos en el distrito Montemorelos se conforma por los municipios, Allende, Montemorelos, Hualahuises

y Linares encontrándose ahí la mayor producción de naranja con 291,217 toneladas de producción y 11.4 toneladas por ha (SIAP, 2011).

Cuadro 8. Producción Regional en Nuevo León.

| Municipio | S./cosechada (Ton) | Produc (Ton) | Valor\$/Producción |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------------|
| Montemorelos | 7,240.00 | 77,253.2 | 89,269.47 |
| Gral. Terán | 6,461.00 | 73,998.5 | 89,281.18 |
| Cadereyta Jiménez | 5,566.98 | 52,596.1 | 62,995.66 |

Fuente: SIAP, 2011

2.7. Producción Regional de Limón (*Citrus aurantifolia*)

2.7.1. Principales municipios productores de limón en el estado de Veracruz, México

Los municipios de Martínez de la Torre, San Rafael y Tlapacoyan (Cuadro 9), son los municipios más representativos en la producción de limón para el estado; Martínez de la Torre cuenta con una superficie de 13,994.06, arrojando ingresos de 643,121.00 pesos, la superficie cosechada en San Rafael arrojó ingresos de 159,232.06 pesos y Tlapacoyan con una superficie de 3, 101.00 ha e ingresos de 154,401.82 pesos (SIAP, 2011).

Cuadro 9. Principales municipios del estado de Veracruz productores de limón.

| Municipio | Superficie | S./Cosech. | Prod./ton. | \$ Ton | Valor\$/Prod. |
|----------------------|------------|------------|------------|----------|---------------|
| Martínez de la Torre | 13,994.06 | 13,994.06 | 197,631.00 | 3,254.15 | 643,121.00 |
| San Rafael | 3,915.00 | 3,910.00 | 57,800.00 | 2,754.88 | 159,232.06 |
| Tlapacoyan | 3,101.00 | 3,101.00 | 45,376.00 | 3,402.72 | 154,401.82 |

Fuente: SIAP 2011

El historial de producción de limón de 11 años (2001-2011) en el estado de Veracruz, se muestra en la Figura 2. Observándose en la gráfica un incremento ascendente del año 2008 al 2011.

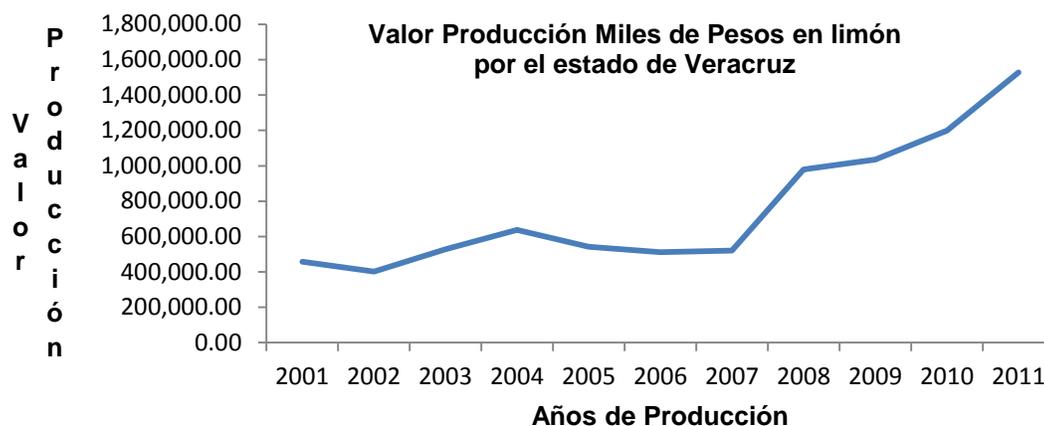


Figura 2. Producción de limón en 11 años en el estado de Veracruz.

2.7.2. Producción regional de naranja (*Citrus sinensis*)

El municipio de Martínez de la Torre, Tuxpan, Panuco, Choapas y San Andrés Tuxtla son los principales productores regionales para el estado de Veracruz, en comparación con los demás municipios productores Huayacocotla, Jaltipan, Veracruz, Fortín, Coatepec (Cuadro 10) (SIAP, 2012).

Cuadro 2. Producción Regional de naranja dulce en el estado de Veracruz.

| Municipio | Sup./cosech. | Prod./Ton. | Valor/Prod. |
|----------------------|--------------|--------------|-------------|
| Tuxpan | 68,882.36 | 1,027,240.90 | 298,680.56 |
| Martínez de la torre | 59,006.00 | 772,205.00 | 516,383.03 |
| Panuco | 8,936.15 | 91,900.75 | 86,607.31 |
| Choapas | 5,498.75 | 37,266.00 | 24,824.82 |
| San Andrés Tuxtla | 1,259.00 | 21,510.00 | 16,132.50 |
| Huayacocotla | 1,726.00 | 17,260.00 | 7,784.43 |
| Jaltipan | 1,784.00 | 14,201.00 | 9,912.35 |
| Veracruz | 150 | 3,722.94 | 4,095.23 |

| | | | |
|----------|-----|----------|----------|
| Fortín | 230 | 2,622.00 | 2,359.80 |
| Coatepec | 190 | 607.5 | 607.5 |

Fuente: SIAP, 2011

En la Figura 2 se muestran los años de producción de naranja del 2001 al 2011, así como sus valores en producción.

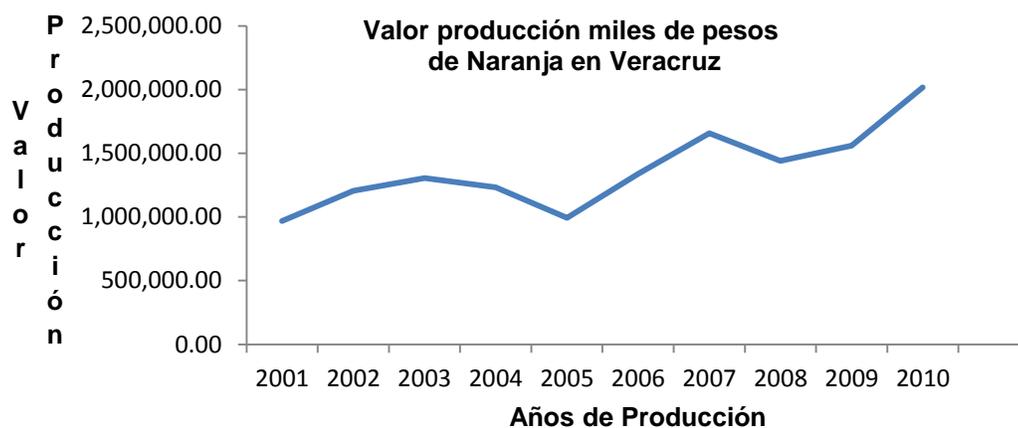


Figura 3. Producción de naranja dulce en 11 años en el estado de Veracruz.

2.8. Principal Factor que está Afectando la Producción Citrícola en México

El principal factor que están afectando la producción citrícola en la actualidad es la aparición de la bacteria *Candidatus liberibacter*, transmitida por el vector *Diaphorina citri* Kuwayama. Los principales estados afectados fueron: Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Chiapas, Hidalgo, Baja California Sur y San Luis Potosí, después del primer reporte de su presencia en el país en julio de 2009 en el municipio de Tizimín, Yucatán. Las plantaciones fueron afectadas por las medidas fitosanitarias implementadas de erradicación de los árboles positivos por *Candidatus liberibacter* (SENASICA, 2011).

2.9. Morfología de *Diaphorina citri* K

La etapa de huevecillos de *D. citri* es característica por su color amarillo brillante hasta tomar un color anaranjado, los huevecillos son de forma ovoide y alargados en uno de sus extremos, su tamaño es de 0.30 mm de longitud y 0.14 mm de ancho aproximadamente; la hembra de *D. citri* coloca sus huevecillos en los brotes tiernos y entre las hojas que se empiezan a desplegar de cualquier variedad de cítricos y algunas especies hospederas (Ver Anexos). Cuenta con cinco estadios ninfales, las ninfas son de color anaranjado-amarillo, no presentan manchas en el abdomen, aplanadas ventralmente, esbozos alares abultadas, ojos rojos compuestos con dos antenas de color negro. El ciclo ninfal se puede llegar en condiciones de 28 °C en un lapso de 15 días (Alemán *et al.*, 2007).

2.9.1. Clasificación taxonómica del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama)

Phyllum: Artrópoda.

Clase: Insecta.

Orden: Hemíptera.

Suborden: Sternorrhyncha.

Superfamilia: Psylloidea.

Familia: Psyllidae.

Género: *Diaphorina*.

Especie: *citri*.

Clasificador: Kuwayama.

Nombre común: Psílido asiático de los cítricos.

(García, 2009).

2.10. Plantas Hospederas de *Diaphorina citri* K

La Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO (2009) menciona que *Diaphorina citri* tiene preferencia por la familia de las Rutáceas. Afecta especialmente a los cítricos dentro de los cuales destacan la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lushington), naranja agria (*Citrus aurantium* L.), pomelo (*Citrus grandis*), Toronjo (*Citrus paradisi* Macfad). También existen hospederos alternativos, como el género *Murraya* spp. (*Murraya paniculata* (L.) Jack (ver Anexo).

2.11. Distribución Geográfica en el Continente Americano de *Diaphorina citri*

Diaphorina citri está ampliamente distribuido en el mundo. El primer reporte de su presencia en el continente americano fue en el Caribe a principios de 1998 en la isla de Guadalupe y en junio del mismo año en Estados Unidos de América, en el estado de Florida, en 2001 fue introducido accidentalmente en Río Grande, Texas. *Diaphorina citri* se encuentra presente en todo el continente americano (Halbert y Manjunath, 2004; Trujillo-Arriaga, 2010). En México *D. citri*, fue reportado oficialmente en el 2002 en el estado de Querétaro; posteriormente en los estados de Tamaulipas y Nuevo León en el 2003 y para el año 2004 se reportó en la región citrícola de Cuitláhuac, Veracruz (Sánchez, 2010), en este mismo año la plaga se extendió hasta los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán según datos reportados por (López *et al.*, 2005). En Tijuana, Baja California, se detectó en Junio de 2008, lo cual representó la invasión total de la citricultura

mexicana. En este mismo año el insecto fue observado alimentándose en jardines del área rural del estado de Coahuila (López *et al.*, 2008).

2.12. Presencia de *Candidatus liberibacter* en las Plantaciones Citrícolas en México

Candidatus liberibacter desde su presencia en México en el año 2009, ha ocasionado la pérdida de plantaciones citrícolas, debido a que ocasiona la muerte de los árboles en lapsos de tres a diez años, una de las medidas fitosanitarias implementadas para su control es la erradicación de los árboles detectados como positivos de la presencia de la bacteria en un lapso no mayor a cinco días NOM-EM-047-FITO (2009). *C. liberibacter* ha avanzado y sigue detectándose la presencia de la enfermedad en huertos comerciales. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), para el mes de agosto del 2014 reportó la presencia de la bacteria en 16 estados productores de cítricos (Cuadro 11) (SENASICA, 2014)

Cuadro 3. Detección del HLB en México.

| Estado | Año/HLB | Mes | Estado | Año/HLB | Mes |
|--------------|---------|-----------|---------------------|---------|------------|
| Yucatán | 2009 | Julio | Chiapas | 2011 | Marzo |
| Quintana Roo | 2009 | Agosto | Baja California Sur | 2011 | Agosto |
| Jalisco | 2009 | Diciembre | Hidalgo | 2011 | Agosto |
| Nayarit | 2009 | Diciembre | Tabasco | 2012 | Diciembre |
| Campeche | 2010 | Marzo | Guerrero | 2013 | Marzo |
| Colima | 2010 | Abril | Puebla | 2013 | Septiembre |
| Sinaloa | 2010 | Junio | Zacatecas | 2013 | Septiembre |
| Michoacán | 2010 | Diciembre | Oaxaca | 2014 | Abril |

2.13. Síntomas Característicos de Huanglongbing de los Cítricos

Una de las características de la presencia de HLB en las hojas es su moteado de manchas con islas verdes, es decir un moteado asimétrico y difuso, se observan retrasos en el crecimiento, aunado a caída de fruto, así como también frutos deformes con un poca coloración o enverdecimiento, se pueden observar también semillas abortadas (pequeñas y oscuras) (Sagaram *et al.*, 2009; Tatineni *et al.*, 2008). Estos síntomas son características únicas de HLB (Robles *et al.*, 2010).

Otra de las características que presentan los árboles infectivos en el campo es el desarrollo de brotes amarillos, característica por la cual se le asignó el nombre dragón amarillo, las hojas llegan a presentar un engrosamiento en sus nervaduras o acorchamiento, aunque también pueden llegar a deformarse de manera que se van alargando llamándolas comúnmente orejas de conejo. Una alteración que presenta en lo que corresponde en etapas fenológicas; es floración fuera de tiempo, caídas de las hojas, muerte de ramas, hasta llegar a la muerte del árbol (Gomez, 2010; Robles *et al.*, 2010).

2.14. Medidas fitosanitarias implementadas para el control de *C. liberibacter*

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del SENASICA, estableció las acciones fitosanitarias para prevenir la introducción y dispersión del HLB en el territorio nacional, algunas de las acciones implementadas fueron: delimitación de las zonas bajo control fitosanitario, eliminación de material infectado, aplicación de métodos de control del vector, toma de muestras, inspecciones, restricción y/o control de la movilización de material

vegetal de especies hospederas de la enfermedad entre otras y conforme a lo establecido en el “Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing” (NOM-EM-047-FITO, 2009).

Pese a las medidas implementadas *C. liberibacter* ha avanzado y sigue detectándose la presencia de la enfermedad en huertos comerciales, los estados que presentan mayor daño son: Colima con 925 huertas, Nayarit con 393, Jalisco y Michoacán con 472 y 48 huertas, respectivamente. En el resto de los estados se han presentado pocas huertas con HLB, Yucatán con 20, Chiapas con 9, Quintana Roo con 2 y Sinaloa con 8 huertas, en los demás casos la presencia de la enfermedad ha sido detectada en traspatios (SENASICA, 2011). Tomando como medida inmediata la erradicación de los árboles infectados, en un plazo no mayor a 5 días (NOM-EM-047-FITO, 2009).

No existen variedades de copa ni patrón resistentes a esta enfermedad y se espera que se puedan generar en mediano y largo plazo. Por lo tanto, el establecimiento de nuevas plantaciones dependerá de un diseño que contemple medidas de manejo de esta enfermedad mediante un paquete sustentable que incremente la producción y con ello se compense las pérdidas provocadas por el HLB. Tres estrategias deben establecerse con este fin: 1) Altas densidad de plantaciones, 2) Sincronizar la brotación vegetativa, 3) El manejo del riego y nutrición (Manzanilla *et al.*, 2012).

2.15. Impacto de la Biotecnología Vegetal

El uso de la biotecnología vegetal es una de las disciplinas científicas que más desarrollo ha demostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa

real para la resolución de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas por parte del hombre. La biotecnología es una práctica que junto con el mejoramiento tradicional utiliza los descubrimientos básicos en el campo de cultivo de tejidos vegetales para la clonación, transferencia de genes, biología molecular y genómica (Altman, 2003; Nehra *et al.*, 2005). Estas disciplinas son sin duda una herramienta invaluable para incrementar la cantidad y calidad de los alimentos de origen vegetal.

2.16. La Importancia del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas, en las cuales se puede utilizar cualquier parte de la planta ya sean tejidos u órganos, en medios de cultivo específicos químicamente definidos, en condiciones controladas *in vitro* y por consecuencia libres de microorganismos (Calva y Ríos, 1999); esta técnica está basada en el principio de totipotencia, en donde se establece que una sola célula vegetal contiene el mismo material genético de la planta donadora (Fertl y Paul, 2000).

2.16.1. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

Dentro de las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales tenemos: el saneamiento de plantas, propagación clonal masiva, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, obtención de nuevas variedades, así como la ingeniería genética (Roca y Ramírez, 2000).

Los elementos de la micropropagación incluye el establecimiento del cultivo, proliferación, enraizamiento y aclimatación de la vitroplantas (Trigiano y Gray, 2011). La variación genética entre las plantas, hace que la micropropagación sea un reto para muchos genotipos (Reed *et al.*, 2013).

2.17. Etapas de la Micropropagación

El cultivo de tejidos vegetales para su establecimiento consiste en cuatro etapas de la micropropagación (Hartmann y Kester, 1999), las cuales son: etapa 0: Selección y preparación de la planta madre, etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico, etapa II: Proliferación de brotes, etapa III: Enraizamiento y la etapa IV: Aclimatación.

2.17.1. Etapa 0: Selección y preparación de la planta madre

Es necesario prestar atención antes de iniciar el cultivo de tejidos a la selección de las plantas madre que deberán presentar las siguientes características: sanas, vigorosas y fuera de estrés (que estén libres de deficiencia o alguna enfermedad presentada por ataque de hongos o virus) para obtener inóculos de muy buena calidad. Obteniendo de este modo cultivos libres de contaminación, siendo esta etapa esencial para los trabajos de micropropagación (Sarasan *et al.*, 2006).

2.17.2. Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico

Para la desinfección del material vegetal, puede utilizarse una solución de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio con un rango de concentración de 1:4 a 1:9. El uso de epicotilos de semillas germinadas asépticamente tiene la ventaja de eliminar la

contaminación microbiana, por lo tanto ya no se esterilizan. Para la esterilización del instrumental y los medios de cultivo, se emplea una autoclave operando con vapor de baja presión, no excediendo 50 cm³ por contenido, a una presión de vapor de 15 lb·in² a una temperatura de 121 °C (250 °F) durante 15 minutos. El tiempo mínimo de esterilización del medio se incrementa cuando el volumen del líquido es incrementado (George *et al.*, 2008).

2.17.3. Etapa II: Proliferación de brotes

Es el continuo sub-cultivo de propágulos con el propósito de obtener el número deseado de plantas y consiste en la aplicación de balances hormonales en medios de cultivo, para estimular la formación de nuevas estructuras que den origen a plantas nuevas (Maene y Debergh, 1985).

2.17.4. Etapa III: Enraizamiento

Las plántulas y brotes obtenidos de la Etapa II son pequeñas, carentes de raíces y no son capaces de soportar por sí solas el crecimiento en el suelo o en otro sustrato. Como lo propone Murashige, (1974), la Etapa III incluye el enraizamiento *in vitro* antes de ser transferido a suelo. En algunas especies se desarrollan raíces adventicias en cultivo *in vitro*, por lo que es necesario que los brotes crezcan en tamaño antes de inducir la formación de raíz, utilizando principalmente auxinas. Los brotes a utilizar deben estar en buenas condiciones, sin presentar vitrificación alguna, pues esta condición interfiere con el proceso de formación de raíces.

2.17.5. Etapa IV: Aclimatación

Es extremadamente importante el momento en que las plántulas son transferidas al ambiente *ex vitro*. Si no son transplantadas cuidadosamente puede significar grandes pérdidas debido a que los brotes han sido desarrollados bajo condiciones de alta humedad y baja intensidad de luz, las hojas de las plántulas bajo estas condiciones poseen menos ceras epicuticulares que plantas cultivadas en invernadero o vivero, por lo que plántulas cultivadas *in vitro* pierden agua rápidamente cuando son cambiadas a condiciones externas. Se requiere de un período de varios días para que las plantas sean completamente capaces de producir su propio recurso de carbono, debido a que cuando son cultivadas *in vitro*, el medio se suplementa con sacarosa (o algún otro carbohidrato) y el cultivo se mantiene con baja luz, por lo que las plántulas no dependen en su totalidad de su propia fotosíntesis (Cano, 2013).

2.18. Ventajas y Desventajas de la Micropropagación

Las técnicas *in vitro* tienen las siguientes ventajas sobre los métodos tradicionales (Avila, 2003):

- Se utilizan pequeños inóculos de plantas para producir un gran número de plántulas.
- Las plántulas pueden ser almacenadas en espacios pequeños y se requiere menos trabajo y espacio para el mantenimiento de plantas madre.
- Las plantas producidas generalmente están libres de bacterias y hongos y en algunos casos las plántulas pueden estar libres de virus.

- Los niveles de nutrientes, luz, temperatura, y otros factores pueden ser fácilmente controlados para acelerar la multiplicación y regeneración vegetativa.
- La micropropagación es independiente a las estaciones del año.
- Las plantas *in vitro* requieren atención mínima entre sub-cultivos; por lo tanto, no necesita trabajo y materiales para regar, desyerbar, etc.

Algunas desventajas son:

- Aunque se pueden producir plantas en gran número, las plántulas obtenidas son inicialmente pequeñas.
- La micropropagación requiere de destreza, instalaciones y equipo especializado.
- La técnica es relativamente costosa.
- Existe la posibilidad de producción de variantes somaclonales.
- Existe la posibilidad de producir brotes vítreos, lo cual implicaría no obtener éxito en el enraizado.

2.19. Técnicas de Conservación *in vitro* a Corto y Mediano Plazo

La conservación de los recursos fitogenéticos, utilizando las técnicas de preservación *in vitro*, ya sea para fines de conservación, mejoramiento genético, investigación o como seguridad alimenticia, ayudan a resguardar el material vegetal susceptible a

plagas o enfermedades e incluso a las condiciones ambientales desfavorables (Sánchez, 2010). La conservación *in vitro* consiste en preservar en medios de cultivo químicamente definidos y en condiciones ambientales controladas en laboratorio explantes de plantas; lo cual involucra ciertas técnicas de establecimiento y almacenamiento, el uso de esta tecnología permite utilizar cualquier parte de la planta desde semillas, embriones, cotiledones, tallos, hojas, ápices, secciones internodales, polen, etc., dependiendo de cada especie (Tyagi *et al.*, 2007). Los bancos de germoplasma *in vitro* ofrecen al propagador, productor o mejorador, una gran diversidad genética para desarrollar nuevos cultivares o híbridos, obteniendo mejores características de fruto, estructura de planta, resistencia o tolerancia a patógenos, incluso tolerancia a condiciones ambientales desfavorables (Keller *et al.*, 2006).

2.20. Propagación *In Vitro* en Cítricos

Son varias las contribuciones por parte de la tecnología del cultivo de tejidos vegetales que aterrizan en la agricultura y la industria (Murashige, 1978; Pierik, 1990); salvaguardan los recursos genéticos que continúa siendo una de las aplicaciones más importantes (Capuana, 2001), ya que puede ser muy útil para la rápida propagación clonal de genotipos superiores en un periodo más corto (Chesick, 1991). Existen trabajos de investigación para la micropropagación de cítricos que se han elaborado como los reportados por Normah *et al.* (1997) los cuales realizaron la organogénesis vía directa, al utilizar hipocótilos de *Citrus halimii* provenientes de plantas propagadas *in vitro*. Establecieron los explantes en medio de cultivo MS suplementado con concentraciones de 0.4-11.1 mM de 6-Benciladenina, reportaron

el mayor número de brotes con medias de 2.2 al utilizar concentraciones 11.1 mM de 6-Benciladenina; para el enraizamiento de los brotes de cítricos, se suplementó al medio de cultivo MS con 2.7 mM de α -acidoneftalenacetico, la sobrevivencia al trasplante fue de 83.3 %.

Por su parte, Jajoo (2010), regeneró plantas de cítricos por medio de nucelas de *Citrus limonia*, seleccionado por sus características de ser un material silvestre, que presenta resistencia a enfermedades, así como a la sequía. Existen estudios que reportan que Bencilaminopurina (BAP) en concentración de 2.22 μ m obtuvo el mayor número de brotes con 18.26 por explante, al realizar la transferencia de medios para la inducción de raíz, donde el mejor tratamiento lo conformó el medio MS suplementado con 2.46 μ m de ácido indolbutirico más BAP en concentración de 1.11 μ m., y se obtuvo el 78 % de enraizamiento en los brotes, con un promedio de raíces en las vitroplantas de 5.53.

Por otro lado, Saini *et al.* (2010), reportan la organogénesis directa y la regeneración de plantas de limón rugoso (*Citrus jambhiri*), al ser utilizados como explantes segmentos de epicotilos colocándolos horizontalmente en los tratamientos para la inducción de brotes, encontrando una frecuencia de inducción de brotes del 83.97 % en el medio MS suplementado con BA al 0.5 mg L⁻¹, con una media de brotes de 8.6 brotes por explante. Asimismo, Savita *et al.* (2010), utilizaron secciones nodales de plantas cultivadas *in vitro* de *Citrus jambhiri* (limón rugoso), estableciendo el protocolo de propagación para la inducción de callo y regeneración de esta especie al utilizar diferentes explantes como raíz, tallo, hoja y secciones internodales, encontrando que las secciones internodales de *C. jambhiri* mostraron mejor

regeneración de 71.89 % al suplementar en el medio de cultivo 0.5 mg L^{-1} de ANA + 3.0 mg L^{-1} de BA.

Sin embargo en otros trabajos de investigación en cultivares como *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi* por Marutani-Hert *et al.* (2011), al utilizar secciones internodales de *Citrus mitis* Blanco (calamondin), *Citrus paradisi* Macf. (Ruby Red), y *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. (Naranja Valencia), evaluando el crecimiento de brotes; encontrando diferencias altamente significativas para el cultivar *Citrus mitis* al someterlo a la interacción de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo MS + BA $0.0 \mu\text{M}$ + AIA $1.0 \mu\text{M}$, para *Citrus sinensis* (BA $0.0 \mu\text{M}$ + IAA $15.5 \mu\text{M}$) y para *Citrus paradisi* (BA $0.0 \mu\text{M}$ + IAA $30 \mu\text{M}$), el mayor número de brotes lo obtuvieron para *Citrus mitis*, en comparación con *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi*, los cuales respondieron de una forma muy similar.

Germanà *et al.* (2011) reportan la formación de brotes adventicios a partir de segmentos de epicotilos provenientes de semillas de *Citrango carrizo*, obteniendo una baja producción de yemas axilares con un 13 % en un lapso de 2 meses, los epicotilos sembrados en medio MS suplementado con BA en concentración de 1 mg L^{-1} produjeron un mayor número de brotes (1.4) en comparación con los suplementados con TDZ en concentración de 0.1 mg L^{-1} con 0.8 brotes. Marques *et al.* (2011) encontraron la mejor respuesta en la formación de brotes adventicios de secciones internodales de *Citrus aurantium*, al utilizar 0.2 mg L^{-1} de BA suplementado al medio de cultivo, arrojando porcentajes de 95 % de brotes con medias de 9.0, reportando también que concentraciones por encima de 1.0 mg L^{-1} de ANA reduce la iniciación de yemas y la elongación de brotes. Singh y Kaur, (2011), utilizaron

explantes nodales de *Citrus jambhiri* (limón rugoso), en medio MS que contenía benciladenina (BA), Kinetina (KN), Zeatina (ZN), en concentraciones de 1.0-2.5 mg L⁻¹. Los mejores resultados para la formación de brotes los obtuvieron en el tratamiento de Kinetina en concentración de 2.0 mg L⁻¹, con porcentajes de 66.66 %, con una longitud en brotes de 0.73 cm. Bhagat *et al.* (2012) reportaron el método para la micropropagación de segmentos nodales de *Citrus jambhiri* (limón rugoso), el cual es un importante portainjerto para las diferentes especies de cítricos, utilizando medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones y combinación es de 6-bencilaminopurina (BAP), Kinetina y N6-isopentil adenosina (2Ip), tuvieron respuesta de regeneración del 75 % de brotes al utilizar 3 mg L⁻¹ de BAP, con una altura de brotes de 1.8 cm. Por su parte, Sharma *et al.* (2012), realizaron la micropropagación de *Citrus kinnow*, por medio de segmentos nodales, evaluando la suplementación al medio MS de BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 mg L⁻¹) y ANA (0.5 mg L⁻¹). Los resultados demostraron que el mejor balance para esta especie fue del BAP (3.0 mg L⁻¹) + ANA (0.5 mg L⁻¹) con 60 brotes, observando que a medida de que se incrementa BAP al medio de cultivo disminuye la brotación en las secciones internodales.

De igual manera, Goswami *et al.* (2013), reportan el protocolo de micropropagación de limón sin semilla al utilizar como explantes secciones nodales, observando la regeneración máxima al utilizar concentraciones de 0.1mg L⁻¹ de BAP o Kinetina 0.5 mg L⁻¹. Para el mayor número de brotes los mejores resultados fueron para el medio con BA en concentración de 0.1 mg L⁻¹ con porcentajes de 62.66 %, seguido por el medio de cultivo suplementado con 0.5 mg L⁻¹ Kinetina con el 50.26 %, reportando

que concentraciones menores del 1.0 mg L⁻¹ de BAP llevaron más tiempo para el crecimiento de las yemas.

Por su parte Haripyaree *et al.* (2011), establecieron utilizando ápices el protocolo de micropropagación para *Citrus megaloxycarpa*, cultivar altamente ácido, el medio de cultivo que ofreció los mejores resultados en cuanto al número de brotes fue MS+ 0.25 mg L⁻¹ de BA + 0.50 mg L⁻¹ de ANA, con 4.7 brotes o 1.0 mg L⁻¹ de BA + 0.50 mg L⁻¹ de Kin, reportando una media de 4.4 brotes.

Asimismo Ibrahim, (2012) reportó la regeneración directa de pomelo (*Citrus grandis*), utilizando como explantes embriones y cotiledones provenientes de árboles adultos de toronja. El medio de cultivo con el que realizó la regeneración estaba constituido por el medio MS suplementado con 2.0 mg L⁻¹ de BA + 0.1 mg L⁻¹ de ANA, arrojando resultados de 9.33 brotes por explante, con una longitud de brotes de 3.0 cm y el 88 % de la proliferación de brotes.

Al igual que Tallón *et al.* (2013) lograron la regeneración directa a partir secciones internodales de *Citrus macrophylla* y *Citrus aurantium*, cultivando los explantes en medios de regeneración suplementado con BA en concentraciones de 2 mg L⁻¹, en combinaciones de Kinetina o ANA, encontrando que la presencia de BA es esencial para la formación de brotes adventicios. Los mejores resultados los encontraron en las concentraciones de 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ para *C. macrophylla* y *C. aurantium*, observando que la combinación de BA con Kinetina o ANA disminuyó la regeneración en comparación con BA. El mejor medio de cultivo para la regeneración de *C. macrophylla* fue el WPM (Woody Plant Medium) (McCown y Lloyd, 1981) o

DKW (Kuniyuki Walnut Medium). Para *C. aurantium* el mayor número de brotes se obtuvo en el medio DKW. Azim *et al.* (2013) reportan los efectos de BA y Kinetina para la formación de brotes e inducción de callo de explantes de semillas, secciones internodales y ápices apicales. Para la formación de brotes la mejor respuesta la obtuvieron para el medio de cultivo MS + 0.1 mg L⁻¹ de BA, en comparación con Kinetina que no se observaron respuesta; sin embargo para la formación de callo de los segmentos internodales, semillas y ápices. El mejor resultado lo obtuvieron suplementando al medio MS + 2,4-D en concentración de 2.0 mg L⁻¹, con un 68 % de inducción de callo.

Mientras que Dewi *et al.* (2014) utilizaron como explantes segmentos de cotiledones así como también epicotilos de *Citrus máxima* (pomelo), encontrando que dentro de seis a ocho semanas empezaron a aparecer brotes adventicios de segmento de epicotilo sembrados en medio MS suplementado con MS + 1.0 mg L⁻¹ BAP + 1.0 mg L⁻¹ Kinetina + 0.5 mg L⁻¹ ANA con porcentajes de 38.8 y 26.3 %, un mayor número de hojas de 1.9 hojas por brote, así como también de raíces con 1.1 por brote. No encontraron diferencias significativas entre la altura de brote, número de hojas y raíz, para ambos explantes, cotiledones y epicotilos, sugiriendo que el mejor medio para toronja es el de menor concentración de Kinetina, MS + 1.0 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg Kin L⁻¹ + 0.5 mg L⁻¹ ANA.

2.21. Técnica Utilizada para el Saneamiento de Brotes

2.21.1. Técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*

Se menciona que la técnica del microinjerto fue propuesta por Murashige *et al.* (1972), pero puesta en práctica por Navarro *et al.* (1975). Dicha técnica consiste en la inducción del desarrollo de un meristemo apical, sobre el epicotilo de un portainjerto proveniente de una semilla germinada *in vitro*, cultivado bajo estrictas condiciones asépticas y establecidas en medios de cultivo apropiados. Además mencionan que por medio de esta técnica es posible encontrar entre un 30 % y 50 % del éxito, en la eliminación de virus, viroides y en algunos casos reportando hasta el 90 %. El uso de meristemos entre 0.12 a 0.18 mm y que posean de 2 a 4 folíolos, son factores óptimos para el éxito de la técnica, encontrando así el equilibrio entre el prendimiento de los microinjertos y la eliminación de patógenos. La frecuencia del éxito se incrementa por el tamaño del explante; pero afectando el porcentaje de saneamiento vegetal. Principalmente las semillas de los patrones a utilizar se germinarán *in vitro*, en completa obscuridad de 10 a 14 días, para después realizar la disección y realizar el microinjerto; la selección de los ápices a utilizar se realiza de árboles enfermos (psorosis, exocortis, cachexia, VTC) o plantas cultivadas en condiciones controladas como invernaderos, malla sombras o incluso macetas con plantas adaptadas a las condiciones de laboratorio, inclusive plantas micropropagadas *in vitro*. Después de realizar los microinjertos en las plantas se deben de cultivar en medios líquidos compuestos por el MS y colocarse en temperatura de 27 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 obscuridad.

La técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* ha demostrado ser la vía más eficaz para obtener material propagado de cítricos libre de virosis, ya que con su utilización se pueden eliminar enfermedades para las que no resulta eficaz la termoterapia. Esta técnica ha demostrado ser superior a los demás métodos para obtener material sano constituyendo la base de los programas de mejoramiento sanitario en países con gran desarrollo cítrico (Navarro, 1980).

2.21.2. Microinjerto en cítricos

Como antecedentes del uso de la técnica podemos mencionar los reportados por Monteverde *et al.* (1987), los cuales obtuvieron plantas de cítricos libres de psorosis y exocortis en árboles infectados a través de la microinjertación de ápices *in vitro*, al utilizar varetas de *Citrus sinensis* enfermos, los cuales fueron seleccionados por la producción y la calidad de la fruta. Los microinjertos se realizaron sobre portainjertos de *Citrange troyer*, fueron sembrados en medio MS Basal suplementado con 75 gr L⁻¹ de sacarosa, incubándose en cámara de crecimiento a 25 °C con 16 hrs de iluminación. Navarro (1980), reportaba la aplicación del uso de ápices, para realizar injertos *in vitro* para especies leñosas. Navarro (1992), menciona que dicha técnica es un método para realizar el saneamiento el cual permite el intercambio de germoplasma en cítricos.

Asimismo, Mukhopadhyay *et al.* (1997), reportan la micropropagación de *Citrus reticulata* al realizar el injerto *in vitro*, utilizando ápices. De igual manera Dass *et al.* (1997), realizan la técnica del microinjerto, para *Citrange troyer*, *Citrange carrizo* y Limón rugoso.

Ding *et al.* (2014) realizaron la propagación de *Citrus reticulata*, al utilizar la técnica del microinjerto sobre el patrón de *Citrus máxima*, sembrándolos en medio MS basal líquido, más la adición de 75 gr L⁻¹ de sacarosa, cultivándose en obscuridad por 7 días y alcanzando sobrevivencias del 67.78 % a los 25 días.

Por otra parte, Zhang *et al.* (2010), realizaron la eliminación HLB en yemas apicales de *Citrus medica*, al detectar la bacteria por PCR. La mayor sobrevivencia de los microinjertos, los obtuvieron al dejar 4 primordios foliares en el ápice microinjertado, pero con la tasa más baja de eliminación del patógeno del 60 %, en comparación con el 100 % de eliminación del patógeno al dejar 2 foliolos en el ápice, pero bajos porcentajes de viabilidad en los microinjertos.

Asimismo, Godoy *et al.* (2013), obtuvieron plantas de *Citrus sinensis* libres de virus a través del uso de la termoterapia y microinjerto de ápices caulinares de cítricos. Como explantes utilizaron varetas de arboles establecidos en campo que presentaban síntomas de la enfermedad, así como varetas de cítricos de árboles establecidos en invernadero con síntomas similares. Utilizando como portainjerto *Citrange troyer*, colocando un ápice conformado por dos o tres primordios foliares y el domo meristemático; realizando una incisión de T invertida en el portainjerto. Sembrándose en tubos de ensaye, los cuales contenían medio de cultivo MS líquido + 100 mg L⁻¹ de inositol + 0.2 mg L⁻¹ de clorhidrato de tiamina + 1.0 mg L⁻¹ de clorhidrato de piridoxina + 1.0 mg L⁻¹ de ácido nicotínico y 70 gr L⁻¹ de sacarosa, ajustando el pH a 5.7. Las plantas microinjertadas fueron mantenidas en iluminación de 1000 luxes, durante 16 horas al día, a una temperatura de 25 °C.

Por otra parte Chae *et al.* (2013), utilizaron la técnica del microinjerto, en combinación con la termoterapia para eliminar el virus de la tristeza de los cítricos. Utilizando como portainjerto *Poncirus trifoliata*. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10 %, por 10 min, sembrándose en medio MS. El pH del medio fue ajustado a 5.7, para posteriormente ser esterilizado a 121 C, por 15 min. Las semillas fueron incubadas a 27 °C, en condiciones de oscuridad, por un lapso de dos semanas. Los microinjertos de naranja, limón, mandarina, kumquart, fueron cultivados en medio MS sin agar, con una concentración del 7 % de sacarosa. Las condiciones de incubación fueron a una temperatura de 27 °C, a 16 hrs luz.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del Experimento

La primera etapa del presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía Unidad Marín N.L., de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Localizado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5. Durante el periodo de Enero a Diciembre del 2013.

La segunda etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Químicas, Región Córdoba-Orizaba, de la Universidad Veracruzana, localizado en Prolongación Oriente 6, No.1779. En el periodo comprendido de Enero a Julio y de Noviembre a Diciembre del 2014.

3.2. Material Vegetal

Para la primera fase del establecimiento *in vitro* fueron utilizadas varetas de 35 cultivares de cítricos de importancia agronómica para el noreste del país (Cuadro 12), donados del banco de germoplasma del lote productor de yemas del Campo Experimental General Francisco Villa, que se localiza en el Km 18.5, Carretera Federal No. 85, en el municipio de Güemez, Tamaulipas. Las varetas están libres de virus y viroides, certificados por la SENASICA (LPY/2012/28/01). Para fines prácticos

del manejo en la investigación, se les asignó un número de identificación a los 35 cultivares de cítricos.

Cuadro 4. Cultivares de cítricos provenientes del Banco de germoplasma del Campo Experimental General Francisco Villa.

| Número | Cultivar | Número | Cultivar |
|--------|-------------------|--------|---------------------|
| 01 | Unnamed | 19 | Orlando |
| 02 | Cutter | 20 | Jaffa |
| 03 | Carrizo | 21 | Troyer |
| 04 | Fortune | 22 | Dancy |
| 05 | Marss early | 23 | Pineapple |
| 06 | Volkameriana | 24 | Swingle |
| 07 | Macrophylla | 25 | Cambell |
| 08 | Rio Red | 26 | L. persa |
| 09 | Sun Chusha | 27 | Smooth flat Seville |
| 10 | Ortanique | 28 | C-32 |
| 11 | Fairchild | 29 | Star Ruby |
| 12 | Lima bearss 1.124 | 30 | Delta |
| 13 | Lana late | 31 | Temple |
| 14 | Cleopatra | 32 | Midkkight |
| 15 | Ruby dux | 33 | Red Blush |
| 16 | Olinda | 34 | L. fino iniacel 49 |
| 17 | Thornes Mexican | 35 | Alen old line |
| 18 | C-35 | | |

3.2.1. Recolectas del material vegetal

Los 35 cultivares de cítricos se obtuvieron del invernadero del lote de productor de yemas (Figura 4), siguiendo los parámetros de seguridad de control sanitario del

material biológico por el personal técnico del Campo Experimental General Francisco Villa. Las varetas se defoliaron dejando parte del peciolo de la hoja, con la finalidad de proteger las yemas axilares.



Figura 4. A) Lote productor de yemas, B) Varetas de 35 cultivares de cítricos

3.3. Condiciones de Traslado a Laboratorio

Los cultivares fueron numerados para facilitar su identificación. Las varetas de las variedades y patrones fueron cubiertas con bolsa de papel de estraza humedecido y con bolsa de polietileno para evitar la deshidratación de los explantes. Previamente protegidas fueron resguardadas en hielera, provista de geles congelados para que el material permaneciera a 4 °C aproximadamente durante el traslado. En el laboratorio el material vegetal se lavó, con la finalidad de eliminar los contaminantes externos que pudiera traer aún (Figura 5). Inmediatamente después fue almacenado en condiciones de refrigeración a 4 °C, hasta realizar el establecimiento *in vitro*.



Figura 5. A) Condiciones de traslado. B) Lavado de material vegetal en Laboratorio.

3.4. Preparación de los Medios de Cultivo para el Establecimiento *in vitro*

Se utilizaron los medios de cultivo constituido por las sales inorgánicas del medios MS (Murashige & Skoog, 1962) y DCR (Gupta y Durzan, 1985) (Cuadro 13) más las vitaminas del medio (Cuadro 14), adicionado 30 gr L⁻¹ de sacarosa. Se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 con 1N KOH o HCl y se agregó 4.0 gr L⁻¹ de Phytigel para solidificar el medio. Se esterilizó a 15 lb·in⁻² por 20 minutos. Para el establecimiento de yemas axilares y meristemos de cítricos.

Cuadro 13. Componentes inorgánicos de los medios de cultivo MS y DCR.

| NUTRIMENTOS (mg L ⁻¹) | MS | DCR |
|---|---------|--------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650.00 | 400.0 |
| KNO ₃ | 1900.00 | 340.00 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 370.00 | 370.00 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.00 | 170.00 |
| CaCl ₂ ·2 H ₂ O | 440.00 | 85.00 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O | | 556.00 |
| KI | 0.83 | 0.83 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 | 6.20 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | | 22.30 |
| ZnSO ₄ ·7 H ₂ O | 8.60 | 8.60 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | 0.25 |
| CuSO ₄ ·5 H ₂ O | 0.025 | 0.25 |
| CoCl ₂ ·6 H ₂ O | 0.025 | 0.025 |
| NiCl ₂ ·6 H ₂ O | | 0.0025 |
| FeSO ₄ ·7 H ₂ O | 27.80 | 27.80 |

| | | |
|--------------------------------------|----------|----------|
| NaEDTA | | 37.30 |
| Na ₂ EDTA | 37.30 | |
| MnSO ₄ 4 H ₂ O | 22.00 | |
| Sacarosa | 30000.00 | 30000.00 |
| pH | 5.7 | 5.7 |

Cuadro 14. Componentes orgánicos de los medios MS y DCR.

| VITAMINAS (mg L⁻¹) | MS | DCR |
|--------------------------------------|-----------|------------|
| Tiamina HCl | 0.1 | 1.0 |
| Glicina | | 2.0 |
| Piridoxina HCl | 0.5 | 5.0 |
| Glutamina | 2.0 | 50.0 |
| Ácido nicotínico | 0.5 | 5.0 |
| Inositol | | 200.0 |
| Myoinositol | 100.00 | |
| Caseina hidrolizada | | 500.0 |

Para la evaluación de los meristemas asépticos se suplementó a los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y DCR (Gupta y Durzan, 1985), con dos concentraciones de BAP (N-6 Bencilaminopurina) y KIN (Kinetina) 0.5 y 1.0 mg L⁻¹, respectivamente.

3.5. Proceso de Desinfección del Material Vegetal

Las varetas de entre 10 y 15 cm de largo de los 35 cultivares se fraccionaron en secciones internodales de aproximadamente 2 a 3 cm con una yema axilar por sección. La pre-desinfección de los explantes consistió en lavar, las varetas con jabón y enjuague. Posteriormente se colocaron en alcohol al 70 % v/v por 2 min, seguido por un enjuague con agua bidestilada (Figura 6 A).

Concluida la pre-desinfección se procedió a trabajar en condiciones asépticas, bajo una campana de flujo laminar, las yemas axilares de los 35 cultivares se colocaron

en soluciones de NaClO (Cuadro 15), de acuerdo con las concentraciones y tiempo concluido se realizaron tres enjuagues con agua esterilizada.

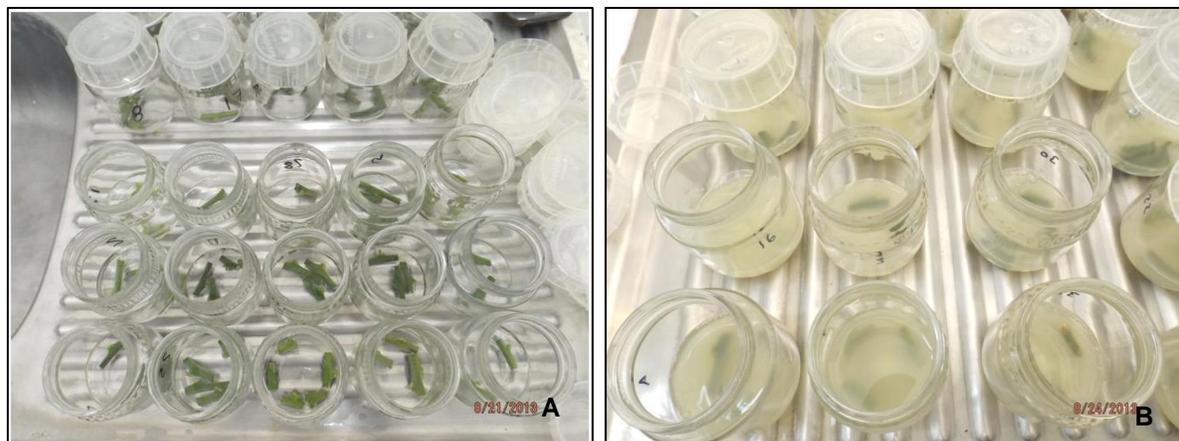


Figura 6. A) Pre-desinfección para yemas axilares. B) Pre-desinfección para meristemos.

La pre-desinfección de los meristemos de los cultivares de cítricos se realizó también de forma antes descrita; enseguida los materiales fueron inmersos en una solución constituida por bactericida Oxitetraciclina 2.0 gr L^{-1} y fungicida Amistar 2.0 gr L^{-1} por un lapso de una hora (Figura 6 B). Transcurrido el tiempo se retiró la solución fúngica y los materiales de los cultivares fueron enjuagados con agua bidestilada. A continuación se procedió a trabajar en campana de flujo laminar; los materiales de los 35 cultivares fueron distribuidos en los tratamientos de desinfección, por un lapso de 15 minutos (Cuadro 15). Para finalizar el proceso, los explantes fueron enjuagados con agua esterilizada para retirar el excedente del agente desinfectante.

Cuadro 15. Tratamientos de desinfección para yemas axilares y meristemos.

| Tratamiento | Cloro v/v | Tiempo Exposición |
|-------------|-----------|-------------------|
| T1 | 10 % | 15 minutos |
| T2 | 15 % | 15 minutos |
| T3 | 20 % | 15 minutos |
| T4 | 25 % | 15 minutos |
| T5 | 30 % | 15 minutos |

3.6. Establecimiento Aséptico de los Explantes

El establecimiento *in vitro* de las yemas axilares fue llevado a cabo en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), en frascos de vidrio. Cada frasco se consideró una unidad experimental constituida por tres yemas axilares, considerándose cada una de ellas una repetición. Las condiciones de incubación a las cuales se sometieron los tratamientos fueron de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperíodo de luz fluorescente (3000 lux) de 16:8 horas luz:oscuridad y las unidades experimentales se distribuyeron al azar en el área de incubación (Figura 7).



Figura 7. Establecimiento aséptico de yemas axilares.

Bajo estas condiciones los materiales permanecieron siete días. La variable a evaluar fue el porcentaje de sobrevivencia de los explantes, la primera evaluación se realizó a los tres días del establecimiento y la última, a los siete días.

Para el establecimiento *in vitro* de los meristemos se procedió a extraerlos, con la ayuda de un estereoscopio, sembrándose en medio de cultivo MS cuatro meristemos por unidad experimental en frascos de vidrio, así como cuatro repeticiones (Figura 8). Las condiciones de incubación para meristemos fueron las mismas que el experimento anterior. Los resultados se evaluaron a las tres semanas después de la siembra, la variable a evaluar fue el porcentaje de sobrevivencia de los meristemos. Los resultados fueron analizados a través de estadística no paramétrica, por lo que fueron transformados a porcentaje utilizando el programa estadístico SPSS (2006), versión 17.0. El análisis se realizó por la prueba de Kruskal-Wallis, (1952).



Figura 8. Establecimiento aséptico de meristemos.

3.7. Etapa de Inducción de Meristemos Asépticos

Para realizar la inducción de meristemos asépticos fueron utilizados los meristemos viables provenientes de la etapa anterior del establecimiento *in vitro*. Los meristemos fueron sembrados en los medios de cultivo el MS (Murashige y Skoog, 1962) y DCR (Gupta y Durzan, 1985), con la finalidad de evaluar las sales básicas de los medios de cultivo, la concentración de los fitoreguladores de crecimiento BAP (N-6 Bencilaminopurina) y KIN (Kinetina) de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ (Cuadro 16). Concluida la siembra de los meristemos las unidades experimentales conformadas por tres o cuatro meristemos, tomándose cada uno de ellos una repetición, fueron incubadas en condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura 16 horas luz, 8 oscuridad, a 25 ± 2 °C. Las unidades experimentales fueron distribuidas bajo un diseño completamente al azar, en estas condiciones permanecieron por cuatro semanas. La variable a evaluar fue el porcentaje de viabilidad en los medios de cultivo. Los resultados fueron transformados a porcentaje y analizados mediante estadística no paramétrica. Utilizando el programa estadísticos SPSS, realizando la prueba de Kruskal-Wallis, (1952).

Cuadro 16. Establecimiento de tratamientos en los medios de cultivo MS y DCR.

| Número | Medio/Fitohor. | Mg L ⁻¹ | Número | Medio/Fitohor. | Mg L ⁻¹ |
|--------|-----------------------|--------------------|--------|------------------------|--------------------|
| 5-7 | MS | 0.0 | 15-17 | DCR | 0.0 |
| 1-4 | T ₁ MS-BAP | 0.5 | 22-25 | T ₂ DCR-KIN | 0.5 |
| 29-31 | T ₁ MS-BAP | 1.0 | 26-28 | T ₂ DCR-KIN | 1.0 |
| 8-10 | T ₂ MS-KIN | 0.5 | 32-35 | T ₁ DCR-BAP | 0.5 |
| 11-14 | T ₂ MS-KIN | 1.0 | 18-21 | T ₁ DCR-BAP | 1.0 |

3.8. Material Vegetal para el Microinjerto

3.8.1. Obtención del material de cítricos certificados

Como plantas donadoras fueron utilizadas plantas de un año y medio de edad. Las plantas (brotes) forman parte del banco de germoplasma del vivero PROCIGO (Promotora Citrícola del Golfo S.A. de C.V.), ubicado en la Carretera Federal Martínez de la Torre-San Rafael Km 12.5 Veracruz, el cual está certificado bajo la Norma Oficial Mexicana-079-FITO-2002, en buen estado agronómico y libre de virus. De igual manera se utilizó material de cítricos certificados provenientes del Campo Experimental General Francisco Villa. La donación consistió en frutos de los portainjertos de *Citrange troyer* y *Citrus volkameriana*.

3.9. Obtención de Frutos de los Campos Certificados

Se colectaron frutos correspondientes a *Citrange C-35* y *Citrus macrophylla* por el personal del Vivero PROCIGO, los cuales fueron identificados para su manejo y traslado al Laboratorio de Criobiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Veracruzana. Los frutos de *Citrange troyer* y *Citrus volkameriana* recolectados en el invernadero de lote productor de semillas del Campo Experimental General Francisco Villa (Figura 9), de igual manera fueron etiquetados por separado para facilitar su identificación, y realizar su traslado a la Facultad de Ciencias Químicas, Región Córdoba-Orizaba.

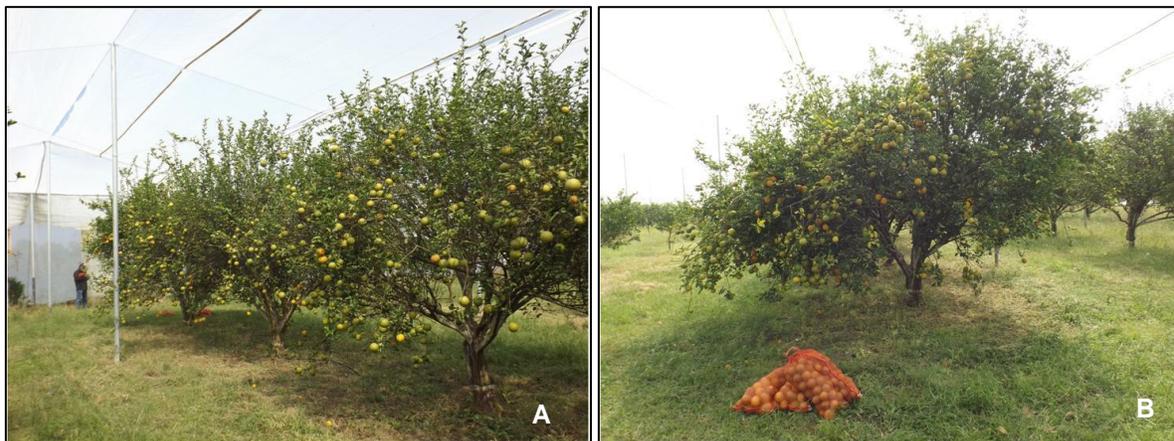


Figura 9. A) Lote Productor de semillas. B) Recolecta de portainjertos.

3.9.1. Disección y extracción de semillas de los frutos

Los frutos de los portainjertos de cítricos fueron lavados con jabón líquido y enjuagados con agua potable con la finalidad de eliminar restos de agentes causantes de contaminación. Continuando con un corte transversal desde el epicarpio hasta el mesocarpio procurando no dañar las semillas. Las cuales se extrajeron (Figura 10), para posteriormente ser enjuagadas con agua bidestilada.

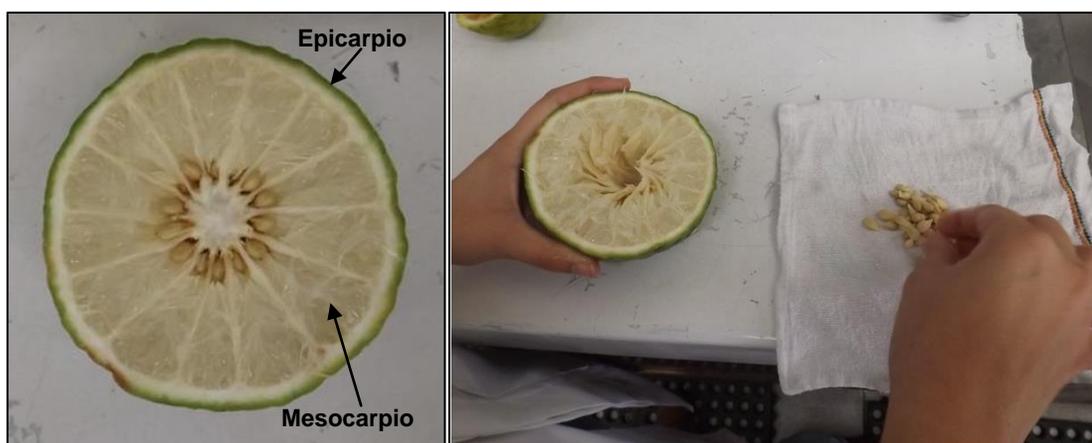


Figura 10. Disección de frutos y extracción de semillas.

3.9.2. Desinfección y siembra *in vitro* de portainjertos de cítricos

Bajo campana de flujo laminar se realizó la desinfección de las semillas de los portainjertos por 10 minutos con una solución de cloro al 0.7 %. Concluido el tiempo de desinfección, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada, continuando a establecer las semillas de los portainjertos en medio MS, suplementado con 30 gr de sacarosa y vitaminas. El pH se ajustó a 5.7 ± 0.02 con 1N KOH o HCl, el medio fue solidificado con 4.0 gr L^{-1} de Phytigel, previamente esterilizado a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 lb^{-1} de presión, por 15 minutos. Las unidades experimentales estaban conformadas por un tubo de ensaye con cuatro semillas, con cuarenta repeticiones para ambos portainjertos, los cuales fueron incubadas en total obscuridad y a temperatura ambiente durante 20 días. Evaluando el porcentaje de germinación del las semillas después de la siembra *in vitro*.

3.10. Acondicionamiento de las Plantas Donadoras

Las plantas donadoras de brotes, provenientes del banco de germoplasma del Vivero PROCIGO, pertenecientes a los cultivares de Naranja Valencia (*Citrus sinensis*), Limón persa (*Citrus latifolia*) y Mandarina (*Citrus reticulata*) variedad Murcott, injertado en *Citrango* C-35, fueron seleccionadas tomando en cuenta la importancia en la producción, superficie establecida y demanda del producto.

3.10.1. Recolección de los brotes de cítricos

Las plantas de cítricos de Naranja Valencia, Limón Persa y Mandarina Murcott, fueron defoliadas en su totalidad para inducir la brotación. Con la finalidad de

asegurar la sanidad vegetal de las plantas donadores de brotes estas fueron mantenidas en una cámara entomológica, la cual se colocó sobre las bases de mesas móviles con las siguientes medidas 1.50 m de ancho por 1.50 m de alto, la cual fue cubierta con tela de organza en su totalidad, dejando una ventanilla para el monitoreo contra *Diaphorina citri* en los nuevos rebrotes (Figura 11). Esta cámara se colocó dentro del invernadero de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana. Las plantas donadoras de brotes fueron defoliadas y colocadas en la cámara entomológica, transcurridos veinte días de la defoliación se realizó la recolecta de brotes los cuales fueron colocados en frascos previamente etiquetados y esterilizados. Inmediatamente después fueron trasladados al laboratorio para iniciar el proceso de desinfección.



Figura 11. Estructura para monitoreo *D. citri* y obtención de brotes.

3.10.2. Establecimiento aséptico de brotes

En condiciones asépticas bajo la campana de flujo laminar se realizó la desinfección de los brotes, los cuales fueron depositados en una solución de 0.25 % v/v de NaClO por 10 minutos, continuando con tres enjuagues con agua esterilizada (Figura

12). Concluido el proceso de desinfección se procedió a colocar los explantes asépticos en cajas petri de vidrio, para llevar a cabo la disección de los ápices con la ayuda de un estereoscopio previamente desinfectado así como material de cristalería e instrumental previamente esterilizado. Los ápices extraídos son colocados en medio MS, para después realizar el microinjerto.



Figura 12. Proceso de desinfección de brotes de cítricos.

3.11. Microinjerto de Ápices Caulinares de Cítricos

Las vitroplantas provenientes de semillas de los portainjertos *Citrange troyer* y *Citrus volkameriana*, son desprovistas del epicotilo dejando aproximadamente 2 cm de largo y 4 cm de radícula. Con respecto a la técnica del microinjerto se realizó el corte de chapa en los tallos, el cual consiste en un triángulo, colocando los ápices de aproximadamente de 0.2 mm (Figura 13). Posteriormente los microinjertos fueron sembrados en tubos de ensaye con medio MS basal líquido y 75 gr L⁻¹ de sacarosa. Con la finalidad de brindar soporte al explante en el medio líquido, se colocó una base de papel filtro en los tubos de ensaye para asegurar que los brotes no se sobrehidratarán. Finalizada la siembra del microinjerto, los tratamientos fueron incubados en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz, 8 oscuridad y a

temperatura ambiente a 25 °C. Después de tres semanas que se realizó el microinjerto. La unidad experimental se conformo por un tubo de ensaye con un microinjerto, con treinta repeticiones. Se evaluó la variable porcentaje de viabilidad de los ápices caulinares de cítricos.



Figura 13. A) Disección de vitroplanta. B) Microinjerto de ápice caulinar de cítrico.

3.12. Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando estadística no paramétrica, iniciando por hacer una transformación a porcentaje y evaluados mediante el programa estadístico SPSS versión 17.0, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y de Ji-Cuadrada para los tratamientos evaluando la viabilidad de los microinjerto, los cuales estuvieron distribuidos sobre un diseño completamente al azar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Proceso de desinfección del material vegetal

La presencia de contaminantes tanto externos como internos afectan el establecimiento de los explantes en condiciones *in vitro* haciendo indispensable el uso de técnicas que permitan la desinfección superficial (Suárez *et al.*, 2005). Por lo que en nuestra investigación los resultados del proceso de desinfección para yemas axilares fue del 50 % de contaminación después de tres días del establecimiento *in vitro*; pero a los siete días fue del 100 % en todos los tratamientos evaluados y se observó que los explantes sufrieron daños por necrosis en sus estructuras probablemente por las dosis o tiempo que permanecieron en el agente desinfectante al que fueron sometidos, aunado a la contaminación por hongos y bacterias en los explantes (Figura 14).

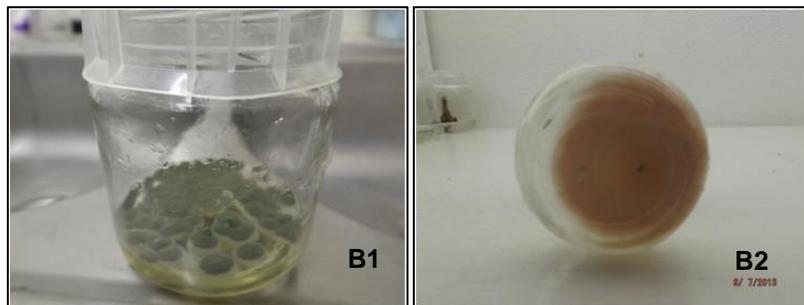


Figura 14. B1) Contaminación por hongos y B2) por bacterias.

Los resultados demuestran que tanto el pre-tratamiento de desinfección por superficie, aunado a las concentraciones de NaClO ocasionaron la muerte de los 35 cultivares de cítricos traídos de invernadero. Las secciones internodales de cada uno de los cultivares, presentaron necrosis en las yemas axilares, imposibilitando así el desarrollo de éstas en el establecimiento *in vitro*. Sin embargo existen reportes que lograron erradicar la contaminación al utilizar NaClO al 5 % más tres gotas de tween-20 por 10 minutos, logrando así la desinfección de secciones nodales de *Psidium guajava*, de plantas jóvenes procedentes de vivero (Ocampo y Núñez, 2007).

Por su parte Ali y Mirza (2006), al utilizar explantes de *Citrus jambhiri*, encontraron porcentajes de contaminación del 55 %, al utilizar como sustancia desinfectante hipoclorito de sodio al 1.0 % por 20 min y 40 % cuando se bajo la concentración del desinfectante al 0.5 %, en un lapso de 10 min. Pero al utilizar cloruro de mercurio al 0.1 % por 5 min, la contaminación fue del 10 % en los explantes. Obteniendo el 90 % de material aséptico de explantes de *Citrus jambhiri*.

Asimismo Vidal y Marco (2014), reporta porcentajes de contaminación por hongos y bacterias del 56 % en yemas axilares provenientes de varetas de árboles de lima ácida, variedad Tahití, al utilizar NaClO al 15 % durante 15 minutos.

Al igual que Chavez *et al.* (2011) quienes encontraron diferencia significativa al evaluar tres tratamientos para la desinfección de yemas apicales de limón criollo. Al utilizar hipoclorito de sodio 1.0 % por 20 minutos, bicloruro de mercurio 0.1 %, por 10 minutos y sulfato de cobre 2.0 % por una hora.

Uno de los principales problemas para el establecimiento aséptico de explantes procedentes de plantas leñosas, principalmente de plantas adultas y que estén establecidas a cielo abierto, es la contaminación por la presencia de microorganismos, principalmente hongos y bacterias. Al utilizar el cultivo *in vitro*, para la regeneración de plantas de algunas especies leñosas, este método exige la búsqueda de técnicas complejas. Uno de los principales problemas a los que se enfrentan los explantes es que deben de sobrevivir a los elevados porcentajes de oxidación, otro factor determinante es la heterogeneidad de respuesta de la especie y así como también a los problemas de aclimatación al ser trasplantadas a sustrato al estar expuestas a las condiciones climatológicas naturales (Perugorría, 2012). Tal es el caso de Rincón *et al.* (1999) que reporta contaminación por bacterias y hongos en yemas axilares de *Annona sp.* Mientras que Zorz *et al.* (2012) reporta el 100 % de la contaminación de secciones nodales de *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro*, al utilizar como sustancia de desinfección alcohol etílico al 70 % por un minuto, presentando contaminación por bacterias todos los explantes. Los resultados obtenidos para yemas axilares de cítricos coinciden con los reportados al encontrar también porcentajes de contaminación del 100 %.

Por otro lado, existen investigaciones en especies leñosas y reportan que el proceso de desinfección en explantes extraídos de plantas leñosas ha sido siempre una de las limitantes para el establecimiento *in vitro* en este tipo de especies, reportándose contaminaciones mayores del 90 % en explantes de guayaba dulce (*Psidium guajava* Mirtaceae) (Viloria *et al.*, 1993). Estos resultados son similares con los obtenidos en

nuestro experimento al encontrar porcentajes de contaminación mayores al 90 % al utilizar yemas axilares en los 35 cultivares evaluados.

Por su parte, Villalobos *et al.* (1999) mencionan que la contaminación por hongos y bacterias es el principal problema que afecta al establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de material adulto de guayaba (*Psidium guajava*), encontrando que el nitrato de plata, cloruro de mercurio e hipoclorito de sodio en concentraciones de 0.5, 0.1, 0.15 % y tiempos de exposición de 5, 10 y 20 minutos no permitieron controlar la contaminación de los explantes afectando la viabilidad. Lo anteriormente mencionado coincide con lo evaluado en nuestra especie en cuanto al tiempo de exposición y las concentraciones del agente desinfectante utilizadas en el presente trabajo no logrando la erradicación de microorganismos causantes de contaminación para yemas axilares de árboles adultos de cítricos.

Mientras que Noda *et al.* (2000) utilizando hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 20 minutos reportaron un 61.7 % de explantes contaminados de *Eucalyptus pellita* provenientes de árboles adultos. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en nuestra investigación debido a que se presentó el 100 % de la contaminación por microorganismos después de 7 días del establecimiento aséptico de yemas axilares.

Al igual que Isea *et al.* (2004) reportaron contaminación del 47.06 % por *Alternaria sp* y de *Curvularia sp* con 52.94 %, al establecer *in vitro* secciones nodales de plantas adultas de mango (*Mangifera indica* L), al utilizar hipoclorito de sodio al 2.625 %, por 15 minutos.

Así como Vila *et al.* (2004) reportan el uso hipoclorito de sodio al 1.6 %, más 3 gotas de tween 20, durante 20 minutos de exposición, arrojándoles el 10 % de contaminación al establecer *in vitro* secciones nodales provenientes de árboles adultos de *Melia azedarach*.

Así mismo Suarez *et al.* (2006) lograron la desinfección y establecimiento *in vitro* de secciones internodales de roble (*Tabebuia rosea* Bertol), al utilizar hipoclorito de sodio al 3 %, por 10 minutos. Mientras que Camacho *et al.* (2006) reportan el 83 % de la contaminación bacteriana en secciones nodales de *Pinus pseudostrobus* provenientes de invernadero, al utilizar hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos.

4.2. Establecimiento Aséptico de Meristemos

Los resultados encontrados con respecto a meristemos presentaron inicios de contaminación a los diez días después de la siembra *in vitro* (Figura 15), pero esta no fue significativa debido a que solo un explante de los siguientes tratamientos (T₄, T₇, T₁₀, T₂₃, T₂₆, T₂₉), presentaban inicios de contaminación (Figura 16). Por lo que se puede concluir que la eliminación de los patógenos de los explantes utilizados en este experimento dependió del proceso de pre-desinfección, del tipo de explante, concentración del agente desinfectante (10,15, 20, 25 y 30 % de NaClO) y tiempo de exposición (15 minutos). Considerando que estos factores fueron los que determinaron la erradicación de microorganismos superficiales de los meristemos utilizados, obteniendo un 95 % de asepsia. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis (1952), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados,

arrojando una significancia de 0.583, para la técnica de disección de meristemas de cítricos



Figura 15. Inicio de contaminación por bacterias.

Nuestros resultados coinciden al encontrar concentraciones menores (5 %) de contaminación de meristemas de cítricos al igual que los reportados por Almeida *et al.* (2003), al utilizar ápices extraídos de secciones internodales de *Citrus sinensis*, lograron erradicar la contaminación al utilizar NaClO en concentración de 2.5 %, por 30 min.

Asimismo Sarma *et al.* (2011), reportan la desinfección de explantes de *Citrus reticulata*, al evaluar NaClO al 1 %, por 10 min, más la adición de alcohol al 70 % por 30 seg. Obteniendo el 93.99 % explantes asepticos. Por su parte Lahoty *et al.* (2013), reportaron un 82 % de asepsia al utilizar explantes de *Citrus reticulata*, evaluando como agente desinfectante cloruro de mercurio en concentración del 0.1 % por 11 minutos.

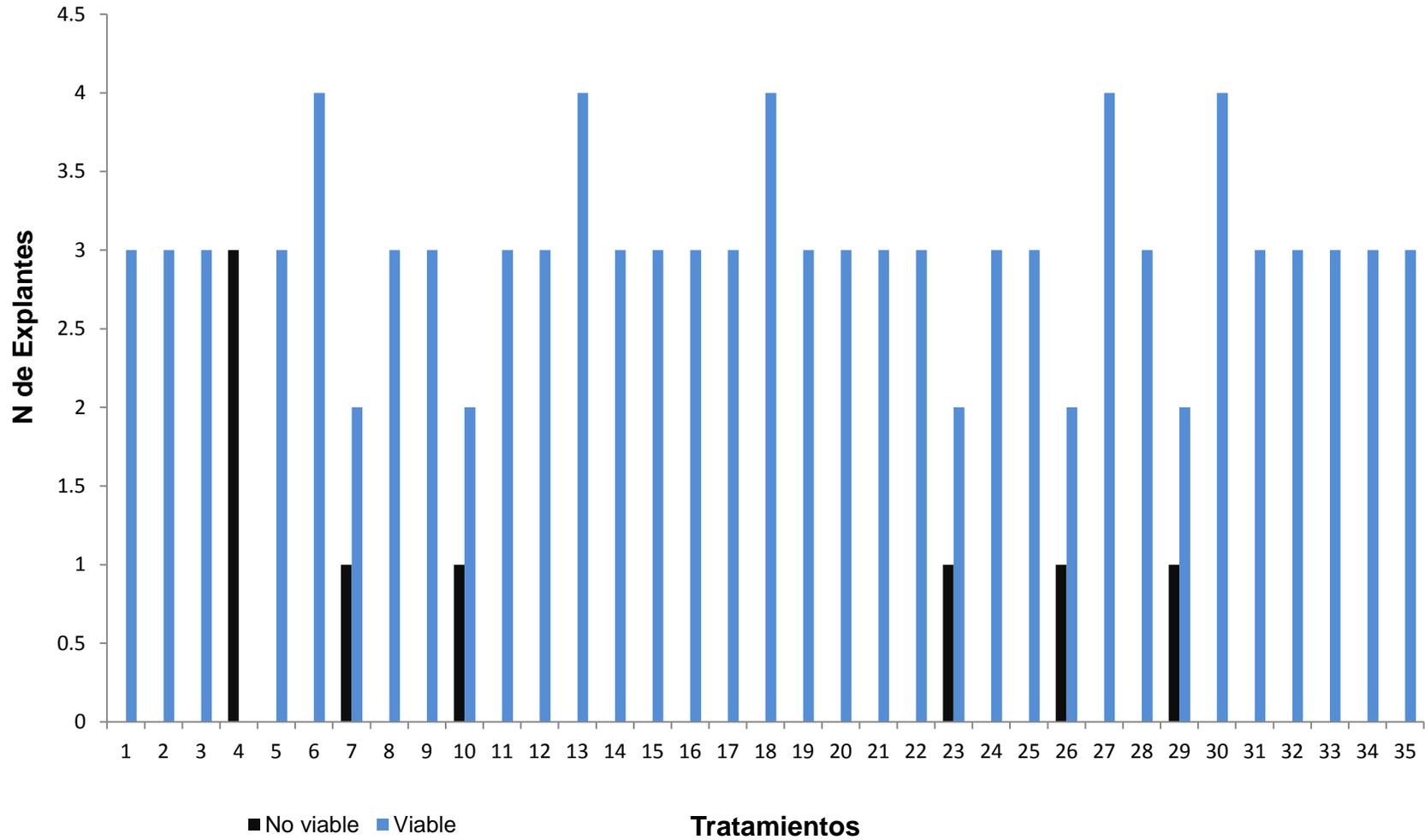


Figura 16. Respuesta *in vitro* de meristemos de 35 cultivares de cítricos.

Asimismo da Silva *et al.* (2008) utilizaron hipoclorito de sodio al 2.5 %, durante 20 minutos para realizar la desinfección por superficie de segmentos de epicotilos de naranja logrando un 80 % de explantes asépticos.

Mientras que, Vinueza y Wilson (2014), reportaron un 70.6 % de asepsia en meristemas de *Citrus aurantifolia*, al evaluar hipoclorito de sodio al 20 %, por 15 min, más alcohol al 70 % por 20 segundos. Por su parte Chavez *et al.* (2011), al no encontrar diferencia significativa al evaluar NaClO en concentración de 1.0 % , durante 20 min, más la adición de cloruro de mercurio al 1.0 %, por 10 min., para la erradicación de la contaminación en secciones nodales de *Citrus lemon*, reportaron el 100 % de explantes asepticos. Estas respuestas se pueden comparar con la obtenidos en nuestra investigación.

4.3. Inducción de Brotes a Partir de Meristemas

La respuesta morfogénica de los cítricos cultivados *in vitro* está influenciada por el genotipo, el tipo de explante que se utilizó, así como también por el medio de cultivo (Pérez-Tornero *et al.*, 2010).

Algunas investigaciones para la inducción de brotes mencionan que la composición de los medios más utilizados para la micropropagación de los cítricos esta dado por nutrientes y vitaminas en el MS (Murashige y Skoog, 1962; Harada y Murai, 1996; Al-Bahrany, 2002; Begum *et al.*, 2004). Tal es el caso de Singh *et al.* (1994), que utilizaron el MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de BAP y

0.5 mg L⁻¹ de Kinetina en ápices provenientes de árboles adultos de 5 a 6 años de edad de mandarina y limón, en cultivares y portainjertos de cítricos.

Existen otros medios de cultivo que se han utilizado como el DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) para la micropropagación de limón. Asimismo El-Morsy y Millet (1996), realizaron el establecimiento *in vitro* del portainjerto *Citrus aurantium* proveniente de semillas, en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con ácido indolbutírico al 0.2 mg L⁻¹, más Kinetina al 0.5 mg L⁻¹. Al igual que, Ali y Mirza (2006), realizaron la micropropagación de limón (*Citrus jambhiri* Lush) por medio de semillas, suplementaron el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) más 2,4-D al 1.5 mg L⁻¹, más BA 3.0 mg L⁻¹ y ANA al 0.5 mg L⁻¹. Esta respuesta es similar con los resultados obtenidos de nuestro experimento al utilizar Kinetina al 0.5 % en el medio de cultivo MS, logrando así la inducción de brotes.

Con respecto a la oxidación en los meristemas se observó después de cuatro semanas del establecimiento *in vitro* en los diferentes tratamientos para inducción de brotes (Figura 17). Se evaluó la respuesta a través de la prueba de Kruskal-Wallis, (1952) para evaluar la respuesta en los tratamientos de medios de cultivo MS y DCR. No encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (p=0.212) (Figura 18).

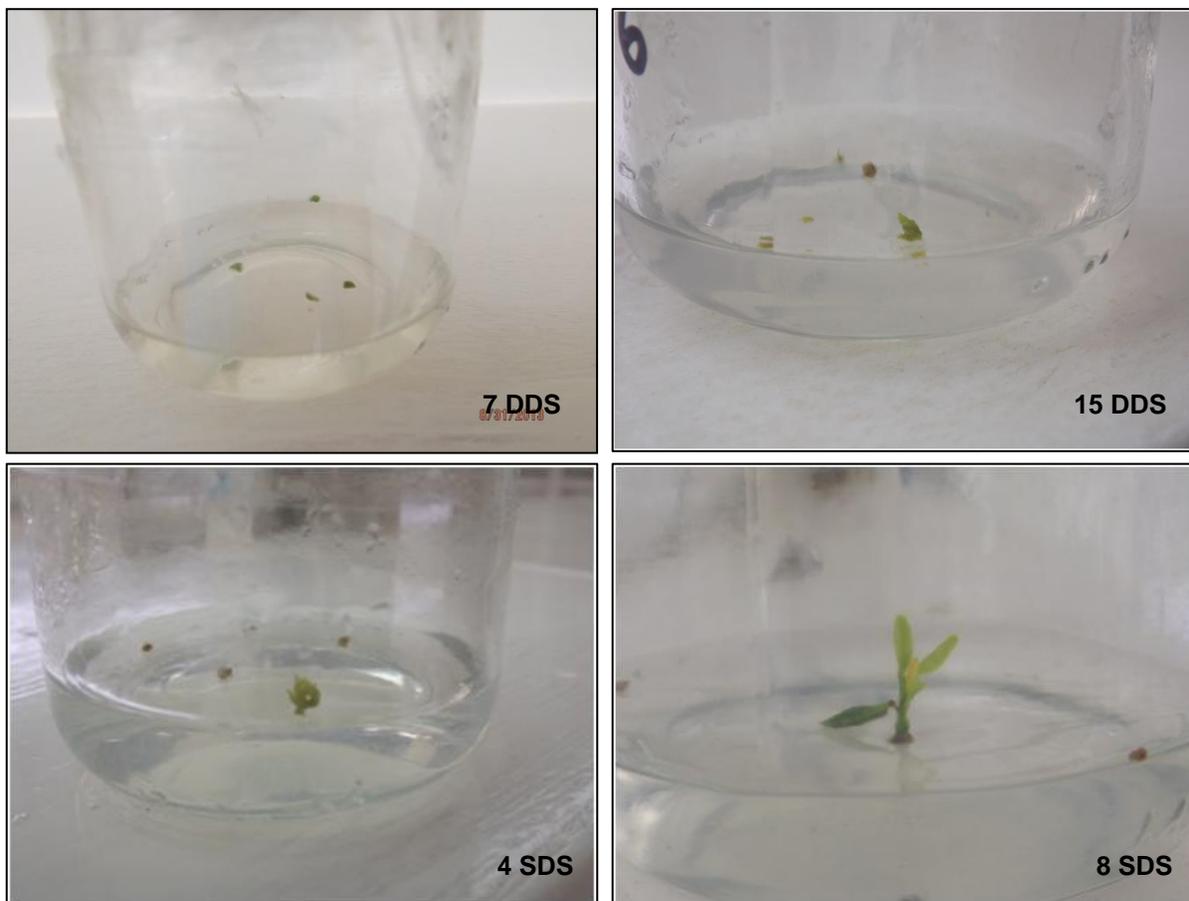


Figura 17. Crecimiento de meristemas.

Para esta respuesta es importante considerar lo reportado por Navarro (1979), quien señala que la mejor respuesta en meristemas de naranjo la obtuvo cuando dejó de 2 a 3 folíolos en el meristemo, ya que en el establecimiento de los meristemas no se dejaron los folíolos en los ápices, se extrajo solo el meristemo apical sin primordios.

Por su parte Pérez-Tornero *et al.*, 2010 reportan que los mejores resultados en cuanto a la proliferación de brotes se han reportado con explantes juveniles al trabajar con la micropropagación de *Citrus spp.* Esta información coincide con la utilizada en nuestra investigación ya que fueron utilizados explantes provenientes de plantas adultas, establecidas en invernadero (lote de producción de yemas). Mientras

que los explantes provenientes de plantas adultas tienen un alto contenido de contaminación, reducen la capacidad morfogénica y los brotes generados *in vitro* (Bonga, 1987; George, 1993).

Mientras que Tallon *et al.* (2012) al realizar la propagación de tres portainjertos de cítricos en tres niveles de reguladores de crecimiento en concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de Benciladenina (BA), no encontrando diferencias significativas para las variables longitud y número de brotes, para Naranja agria y Mandarina Cleopatra, encontrando los mejores resultados en las concentraciones de 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ de BA en cuanto a la proliferación de brotes para Mandarina Cleopatra, no encontró diferencia significativa al utilizar Kinetina en concentraciones de 1.0 y 3.0 mg L⁻¹, para ninguna de las variables estudiadas.

Estos resultados coinciden también por los reportados por Thomson-Begum (2004), al utilizar segmentos internodales de tres variedades de toronja (pulpa de color rosa, de color blanca y de color rojo), cultivadas en medio MS que contenía 1.0 mg L⁻¹ de BAP, obteniendo la proliferación de yemas axilares a las cuatro semanas del cultivo *in vitro*. Esta respuesta es similar a los resultados obtenidos en nuestra investigación al no encontrar diferencias significativas para la inducción de brotes.

De igual manera los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Nwe *et al.* (2014), al no encontrar diferencias significativas entre tratamientos, al utilizar segmentos de epicotilos y cotiledones de naranja miel (*Citrus tangerina*), al ser cultivados en medio MS complementado con 8.88 µM de N6-benciladenina (BA) y

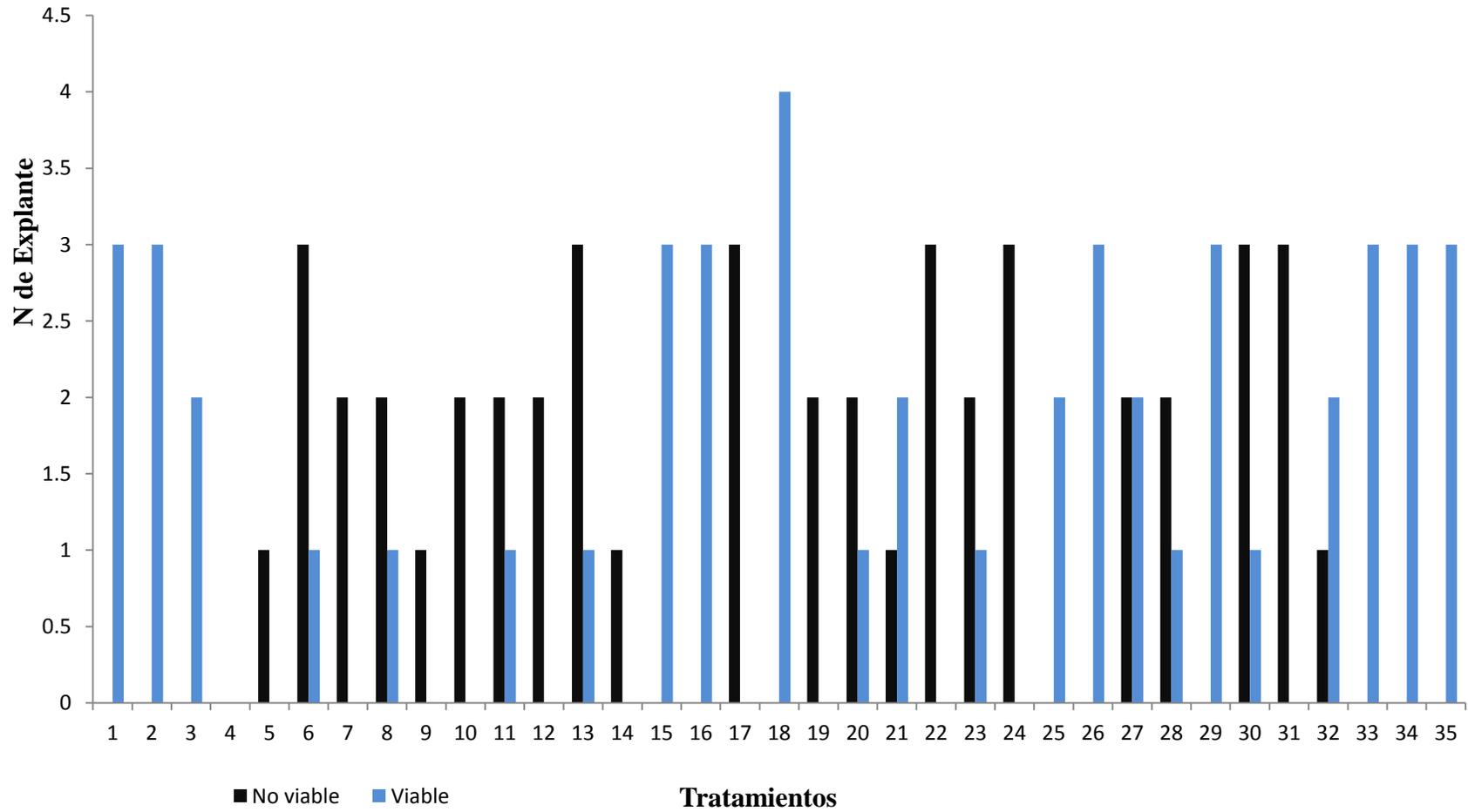


Figura 18. Tratamientos evaluados en medios de cultivos MS y DCR de 35 cultivares de cítricos.

0.54 μ M ácido naftalenacético (ANA), la fitohormona BA 6-N benciladenina es la más utilizada comúnmente en la micropropagación de *Citrus spp*, reportada como la más eficiente para la regeneración de brotes.

Sin embargo Eng *et al.* (2015), mencionan que BA no es suficiente para la regeneración normal de brotes de *Citrus hystrix* debido a la senescencia foliar en los brotes generados. La inclusión de nitrato de plata (AgNO_3) en concentración de 10.0 mM en el medio MS más adición de 2.22 mM de BA, provoca que se supere la senescencia de las hojas, mejorando así la regeneración de brotes en los diferentes explantes evaluados nudo cotiledonal, cotiledones, hipocótilo, así como la raíz primaria de *Citrus hystrix*.

4.4. Evaluación de la Técnica del Microinjerto

La respuesta de los explantes se evaluó después de veinte días del establecimiento de la siembra de las semillas, el porcentaje de germinación observado fue del 93.75 % en el portainjerto *Citrange troyer*, en comparación *Citrus volkameriana* el cual fue del 81.25 %.

Por otro lado con respecto al porcentaje de viabilidad de los ápices caulinares de los microinjertos después de 18 días, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, (1952) la cual no mostró diferencia significancia entre tratamientos. Por tal motivo se optó por evaluar los resultados a través de una prueba de Ji-Cuadrada pero ahora considerando días después de la siembra de los microinjertos. Encontrándose diferencia estadística para la segunda fecha de muestreo a los 4 días después del microinjerto, para ambos portainjertos *Citrus*

volkameriana y *Citrang troyer*. En general se observó mayor porcentaje de ápices viables en el patrón *Citrang troyer*, en comparación con el portainjerto *Citrus volkameriana*.

Mientras que al realizar los muestreos para el portainjerto *Citrang troyer*, se observó inició de con la necrosis de ápices, en la tercer semana de muestreo a los once días de haber realizado el microinjerto, con un 13.33 % de daño en los microinjertos. Para el portainjerto *Citrus volkameriana* se observó un mayor daño en los ápices en las primeras dos fechas de muestreo a las veinticuatro horas y a los cuatro días después del microinjerto con un 20 y 33.33 %, respectivamente (Cuadro 17).

Cuadro 17. Porcentaje de ápices no viables de los portainjertos de cítricos (*C. volkameriana* y *C. troyer*), durante dieciocho días.

| DDM | <i>Citrus volkameriana</i> | <i>Citrang troyer</i> | Ji-Cuadrada | Significancia |
|-----|----------------------------|-----------------------|-------------|---------------|
| 1 | 20.00 | 0.00 | 3.33 | 0.068 |
| 4 | 33.33 | 0.00 | 6.00 | 0.014 |
| 11 | 40.00 | 13.33 | 2.73 | 0.099 |
| 15 | 40.00 | 26.67 | 0.60 | 0.439 |
| 18 | 53.33 | 33.33 | 1.22 | 0.269 |

DDM: día después del microinjerto

En ambos patrones se observó que a medida que pasaba el tiempo el número de ápices viables se ve disminuido, finalizando con un 66.67 % para el portainjerto *Citrang troyer* y 46.67 % para *Citrus volkameriana* a los 18 días después del microinjerto.

Esta respuesta la podemos avalar con lo mencionado por Navarro (1992) que reportó que el éxito del microinjerto está influenciado por el grado de desdiferenciación del patrón, la cual depende de la edad de este y la luz. De igual manera Hartmann *et al.* (1997) mencionan que el éxito del microinjerto puede estar

relacionado con tres factores principalmente: la compatibilidad fisiológica del portainjerto y del esqueje, la diferencia de edades entre las vitroplantas y la etapa de desarrollo de las células parenquimatosas que ayudara a la unión del portainjerto y esqueje. Así mismo Ding *et al.* (2014), realizaron la propagación de *Citrus reticulata*, utilizando la técnica del microinjerto, sobre el patrón de *Citrus máxima*, alcanzando sobrevivencias del 67.78 % a los 25 días. De igual manera Mukhopadhyay *et al.* (1997), al realizar el uso del microinjerto de *Citrus reticulata* en Naranja, limón y lima Rangpur, encuentran la mejor respuesta con plántulas de 14 y 21 días, con porcentajes de sobrevivencia para limón del 52 %, para naranja del 60 % y para lima del 40 %. Esta información coincide con los resultados en nuestro experimento al encontrar el 66.67 % de sobrevivencia de microinjertos, pero difieren en los días de respuesta después de 18 días de haber realizado el establecimiento *in vitro*. Mientras que Dass *et al.* (1997), reportan el éxito de la técnica del microinjerto realizados en *Citrangle troyer*, *Citrangle carrizo* y limón Rough, con porcentajes de 32.25 % en 8 a 13 días, 29.60 % en 10 a 12 días y 25.78 % en 10 a 12 días respectivamente. Por su parte Godoy *et al.* (2013), reportan el 0 % de sobrevivencia en los microinjertos al utilizar varetas de *Citrus sinensis* de la variedad Folha murcha traídas de invernadero. Al cultivar *in vitro* varetas de la misma variedad encontrando prendimientos del 10.3 %, sobre el patrón *Citrangle troyer*.

5. CONCLUSIONES

La técnica de desinfección utilizada en los materiales fue la adecuada ya que se logró el establecimiento aséptico del material vegetal proveniente de invernaderos certificados. Esta respuesta es favorable para iniciar el establecimiento *in vitro* de los cultivares de cítricos de interés, a través del uso de meristemos logrando un 95 % de material aséptico.

Con respecto a los medios de cultivo, MS (Murashige & Skoog, 1962) y DCR (Gupta y Durzan, 1985), se puede concluir que se logró el establecimiento e inducción *in vitro* para meristemos con los dos medios. En el caso de yemas axilares no se logró con ninguno de los medios el establecimiento *in vitro*.

El uso de la técnica del microinjerto permitió la regeneración de ápices caulinares de cítricos para el portainjerto *Citrange troyer*.

6. RECOMENDACIONES

Con respecto al establecimiento *in vitro* de la especie, se recomienda evaluar diferentes agentes desinfectantes, dosis y tiempos de exposición en yemas axilares, ya que en esta investigación no se logró erradicar la contaminación para estos explantes.

Para garantizar una adecuada recuperación del material microinjertado, es necesario lograr sincronizar la germinación *in vitro* de las semillas de los portainjertos utilizados, así como la brotación de las plantas de cítricos de las cuales se obtienen los explantes a microinjertar. Con la finalidad de lograr una apropiada ubicación y conexión entre el ápice caulinar y el portainjerto de los cítricos, es importante definir el tipo y las dimensiones del corte que se realizará para la operación del microinjerto. Se requiere continuar perfeccionando la técnica y práctica del microinjerto, lo que permitirá evaluar correctamente el efecto de la conexión entre el portainjerto y la variedad o copa de los cítricos y así definir la metodología más apropiada para los siguientes trabajos de investigación relacionados a este campo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Bahrany, A.M. (2002) Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*, 95(4), 285-295.
- Alemán, J., Baños, H. y Ravelo, J. (2007) *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing una combinación destructiva para la producción citrícola. *Protección Vegetal*, 22: 3, 154-165.
- Ali, S. y Mirza, B. (2006) Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Botanica Croatica*, 65(2), 137-146.
- Almeida, W., Mourão Filho, F., Pino, L., Boscariol, R., Rodriguez, A. y Mendes, B. (2003) Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Science*, 164(2), 203-211.
- Altman A. 2003. From plant tissue culture to biotechnology: Scientific revolutions, abiotic stress tolerance, and forestry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 39: 72- 75.
- Armendáriz, H.K.C. (2014) Establecimiento de un protocolo de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* a partir de yemas apicales de plantas juveniles de magnolia (*Magnolia grandiflora*) para la producción masiva, repoblación en el Distrito Metropolitano de Quito, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- Avila, R. (2003) Micropropagación y crioconservación de *Ariocarpus bravoanus* (Hernandez y Anderson), cactácea en peligro de extinción. . in: *Biología, Tecnológico de Ciudad Victoria Tamaulipas*.
- Azim, F., Rahman, M., Prodhan, S.H., Sikdar, S.U., Zobayer, N. y Ashrafuzzaman, M. (2013) Development of Efficient Callus Initiation of Malta (*Citrus sinensis*) Through Tissue Culture. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, 1(1-2), 64-68.
- Begum, Amin, N., Islam y Azad, M. (2004) A comparative study of axillary shoot proliferation from the nodal explants of three varieties pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.). *Biotechnology Advances*, 3, 46–62.
- Bhagat, A., Pati, P.K., Virk, G. y Nagpal, A. (2012) An efficient micropropagation protocol for *Citrus jambhiri* Lush. and assessment of clonal fidelity employing

- anatomical studies and RAPD markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 512-520.
- Bonga, J. (1987) Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. in: *Cell and tissue culture in forestry*, Springer, pp. 249-271.
- Calva, C.G. y Ríos, L.E. (1999) Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. *En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología.*, pp 267-301.
- Camacho, V. R., Rentería, A. A., & Jiménez, H. C. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana*, 8(2), 27-32.
- Cano, C.M. (2013) Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés.
- Capuana M. 2001. Cloning of Italian forest tree species by *in vitro* techniques. Ph. D. Dissertation. University Gent. Belgium. 116.
- Chae, C.W., Yun, S.H., Park, J.H., Hyun, J.W., Koh, S.W. y Lee, D.H. (2013) Micrografting and Heat Treatment Combination for Eliminating Virus of CTV-infected Citrus. *Journal of Life Science*, 23(2), 267-272.
- Chavez, J., Arboleda y Marlon (2011) Propagación *in vitro* del limón criollo (*Citrus limon*) con el empleo de dos reguladores de crecimiento.
- Chesick EE, Mohn CA, Hackett WP. 1991. Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobus* L.) embryos *in vitro*; bud induction and rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 26: 107-114.
- da Silva, R.P., Mendes, B.M.J. y Mourão Filho, F.d.A.A. (2008) Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedo. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 43(10), 1331-1337.
- Dass, H., Vijayakumari, N. y Singh, A. (1997) Effect of different rootstocks on success of *in vitro* shoot tip grafting in Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Indian Journal of Horticulture*, 54(1), 11-13.
- Dewi, I.S., Rahman, I. y Purwoko, B.S. (2014) Plant Regeneration of Pummelo cv. Cikoneng from Cotyledon and Epicotyl. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 41(2).
- Ding, M., Zhi-dan y Yi-sheng (2014) Studies on *in vitro* Micrografting of Mature *Citrus reticulata* Blanco 'Kinokuni'(Tanaka) HH Hu. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2, 011.
- El-Morsy, A. y Millet, B. (1996) Rhythmic Growth and Optimization of Micropropagation: The Effect of Excision Time and Position of Axillary Buds on *in vitro* Culture of *Citrus aurantium* L. *Annals of botany*, 78(2), 197-202.
- Eng, W.H., Aziz, M.A. y Sinniah, U.R. (2015) *In vitro* regeneration of *Citrus hystrix* DC. *Brazilian Journal of Botany*, 1-8.
- FAO (2007) Producción de productos alimentarios agrícolas.
- FAO (2012) Frutos cítricos. 46.
- Ferl, R. y Paul, A.L. (2000) Genome organization and expression. *En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists*, pp. 312-357.
- García, D.S.C. (2009) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB – Greening). Argentina.

- George, E.F. (1993) *Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology*. Exegetics limited.
- George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk, G.-J. (2008) *The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients*. Springer.
- Germanà, M.A., Micheli, M., Chiancone, B., Macaluso, L. y Standardi, A. (2011) Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange *Citrus sinensis* (L.) Osb.x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 299-307.
- Godoy, G.M., Romero, N.V. y Segnana, L.G. (2013) Obtención de plantas de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck V. Folha murcha, libres del virus de la psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. *Investigación Agraria*, 6(1), 15-19.
- Gomez, D. (2010) Síntomas de Huanglongbing (HLB) y de Deficiencias Nutricionales. In: 2° Taller internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos. Mérida, Yucatán.
- Goswami, K., Sharma, R., Singh, P. y Singh, G. (2013) Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 137-145.
- Gupta, P.K. y Durzan, D.J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant cell Rep* 4 (1985), p 177.
- Halbert, S.E. y Manjunath, K.L. (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3), 330-353.
- Harada y Murai (1996) Clonal propagation of *Poncirus trifoliata* through culture of shoot primordia. *J Horticult Sci.*, 71., 887-892.
- Haripyaree, A., Guneshwor, K., Sunitibala, H. y Damayanti, M. (2011) *In vitro* propagation of *Citrus megaloxycarpa*. *Envir. Exper. Biol*, 9, 129-132.
- Hartmann, T.H. y Kester, D.E. (1999) Propagación de plantas. Principios y Práctica. 7a impresión. México. , 549-608 pp. .
- Hartmann, H., Kester, D., Davie, F. y Geneve, R. (1997) Plant propagation Principles and Practices, (Ed.) N.D. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., Vol. (6th edition), pp. 199-210, 414, 462.
- Ibrahim, M. (2012) *In vitro* plant regeneration of local pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck.) via direct and indirect organogenesis. *Genetics and Plant Physiology*, 2(3-4), 187-191.
- Isea, F., Escalante, M., Urdaneta, J., & Villalobos, M. R. (2004). Presencia de hongos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21(4).
- Jajoo, A. (2010) *In vitro* propagation of *Citrus limonia* Osbeck through nucellar embryo culture. *Curr. Res. J. Bio. Sci*, 2(1), 6-8.
- Keller, E.J., Senula, A., Leunufna, S. y Grübe, M. (2006) Slow growth storage and cryopreservation—tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*, 29(3), 411-417.

- Kruskal, W.H. y Wallis, W.A. (1952) Allen Wallis. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47 (260), 583-621.
- Lahoty, P., Singh, J., Bhatnagar, P., Rajpurohit, D. y Singh, B. (2013) *In vitro* Multiplication of Nagpur Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Through STG. *Vegetos-An International Journal of Plant Research*, 26(2), 318-324.
- López, A.J.I., Peña, M.A., A., R.M. y J., L. (2005) Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homóptera: Psyllidae). In: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, México. pp: 88. In: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, México. pp: 88.
- López, Jasso, J., Reyes, M.A., Loera, J., Cortez, E. y Miranda, M.A. (2008) Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico.
- Maene, L. y Debergh, P. (1985) Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 5(1), 23-33.
- Manzanilla, R.M.A., Robles, G.M.M., Medina, U.V.M., Velázquez. M.J.J., Carrillo, M.S.H., Orozco, S.M. y Padrón, C.J.E. (2012) Efecto de portainjertos achaparrantes sobre tres variedades de Limón Mexicano. *Memorias VII Reunión Nacional de Innovación Agrícola, Querétaro 2012*, 89.
- Marques, N.T., Nolasco, G.B. y Leitão, J.P. (2011) Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Scientia Horticulturae*, 129(2), 176-182.
- Marutani-Hert, M., Evens, T.J., McCollum, G.T. y Niedz, R.P. (2011) Bud emergence and shoot growth from mature citrus nodal stem segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(1), 81-91.
- McCown, B. y Lloyd, G. (1981) Woody plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. *HortScience*. amer soc horticultural science 701 north saint asaph street, alexandria, va 22314-1998. pp. 453-453.
- Monteverde, E.E., García, M.L. y Briceño, M. (1987) Obtencion de plantas citricas libres de psorosis y exocortis en árboles infectados a traves de la microinjertacion de ápices *in vitro*. *Agron. Trop*, 36, 5-14.
- Mukhopadhyay, S., Rai, J., Sharma, B., Gurung, A., Sengupta, R. y Nath, P. (1997) Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. *Journal of Horticultural Science*, 72(3), 493-500.
- Murashige T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. University of Calgary. Canada. 15-27.
- Murashige y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15(3):, 473-497.
- Murashige, Bitters, W., Rangan, T., Nauer, E., Roistacher, C. y Holliday, P. (1972) technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *HortScience*.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.

- Navarro (1980) Microingerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus,. *Bol. Serv. Plagas.* , 5, 127-148.
- Navarro (1992) *Citrus* shoot tip grafting *in vitro*. in: *High-Tech and Micropropagation II*, Springer, pp. 327-338.
- Navarro, Roistacher y Murashige (1975) Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100(5), 471-479.
- Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L. 2005. Invited review: forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 701-717
- Noda J, A. L., Álvarez, O, P. A., Junco, L., García M., & Sotolongo-S, R. (2000). Propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus pellita*, F. MUELL. *Revista Chapingo Ciencias Forestales y del Ambiente*, 7(1), 29-33.
- NOM-EM-047-FITO (2009) por la que se establecen las acciones fitosanitarias para mitigar el riesgo de introducción y dispersión del Huanglongbing (HLB) de los cítricos (*Candidatus liberibacter spp*) en el territorio nacional.
- Normah, M., Hamidah, S. y Ghani, F. (1997) Micropropagation of *Citrus halimii* an endangered species of South-east Asia. *Plant cell, tissue and organ culture*, 50(3), 225-227.
- Nwe, Y.Y., Myint, K.T., Mochizuki, Y., Vazirzanjani, M., Okayasu, K., Suzuki, S. y Ogiwara, I. (2014) *In vitro* regeneration through direct shoot organogenesis in Honey Orange (*Citrus tangerina*). *Plant Biotechnology*, 31(4), 341-344.
- Ocampo, F., & Núñez, V. M. (2013). Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1), 22-27.
- Ordúz-Rodríguez, J.O. y Mateus-Cagua, D.M. (2012) Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia.
- Ortega-Gaucin, D. (2011) *Diagnóstico sobre la gestión y el uso del agua en el sector agropecuario de Nuevo León*. Instituto del Agua de NL.
- Pérez-Tornero, O., Tallón, C.I. y Porras, I. (2010) An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 100., 263–271.
- Perugorría, M. (2012) Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores.
- Pierik RLM. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. pp 109 -110.
- Reed, B.M., DeNoma, J., Wada, S. y Postman, J. (2013) Micropropagation of Pear (*Pyrus sp.*). in: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, Springer, pp. 3-18.
- Rincón, A., Ortega, R., Urdaneta, J., de Sierralta, S.L., Bracho, B. y Ramírez, M. (1999) Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona spp*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16(01).
- Robles, G., Velázquez, M., Manzanilla, R., Orozco, S., Flores, V. y Medina, U. (2010) 1^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Monterrey Nuevo León.

- Robles, G.M.M. (2006) Capacidad de *Agrobacterium rhizogenes* para la transformación genética de tejidos maduros de cítricos. in: *Bioteconología*, Universidad de Colima, pp. 173.
- Roca, W. y Ramírez (2000) *Introducción a la biotecnología vegetal*. CEDAF.
- Sagaram, U.S., DeAngelis, K.M., Trivedi, P., Andersen, G.L., Lu, S.-E. y Wang, N. (2009) Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected *citrus*, using PhyloChip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1566-1574.
- SAGARPA (2009) Estadísticas de Cítricos, Superficie Cosechada, Sembrada y Producción. .
- SAGARPA (2012) México, entre los líderes en producción de cítricos a nivel mundial.
- Saini, H., Gill, M. y Gill, M. (2010) Direct shoot organogenesis and plant regeneration in rough lemon(*Citrus jambhiri* Lush.). *Indian Journal of Biotechnology*, 9(4), 419-423.
- Sánchez, B.M. (2010) Biología, ecología y control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México*, 48.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. y Rowntree, J.K. (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3), 206-214.
- Savita, V., Virk, G. y Nagpal, A. (2010) Effect of explant type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in *Citrus jambhiri* Lush. *Env. and We-An Intern*, 97-106.
- SENASICA (2011) Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección de Regulación Fitosanitaria. México DF.
- SENASICA (2014) Situación fitosanitaria actual del Huanglongbing de los cítricos.
- Sharma, T., KHAN, M.K., Misra, P. y Shukla, P.K. (2012) Micropropagation of *Kinnow* through nodal explants. *The Bioscan*, 7(2), 295-297.
- SIAP (2011) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Acuicola y Pesquera. Informe mensual (periodo: 1 de enero al 30 de septiembre de 2011): acciones contra el Huanglongbing o HLB.
- SIAP (2012) Principales Estados Productores de Cítricos.
- Singh, B. y Kaur, A. (2011) Comparison of agar and gum karaya as gelling agent for *in vitro* regeneration of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) plantlets from nodal explants. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 14(4), 297-303.
- Singh, S., Ray, B., Bhattacharyya, S. y Deka, P. (1994) *In vitro* propagation of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm. f. *HortScience*, 29(3), 214-216.
- SPSS (2006) Versión 17.0. 0. *Chicago: SPSS Inc. IBM.[Links]*.
- Suárez, I. E., Jarma, A. J., & Avila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Temas Agrarios*, 11(2).
- Suárez, I.; Schnell, R.; Kuhn, D. y Litz, R. 2005. Micrografting of ASBVdinfected avocado (*Persea americana*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80:179-185

- Tallón, C., Porras y Pérez, T. (2012) Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 48, 488–499.
- Tallón, C.I., Porras y Pérez, O. (2013) High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(2), 145-155.
- Tatineni, S., Sagaram, U.S., Gowda, S., Robertson, C.J., Dawson, W.O., Iwanami, T. y Wang, N. (2008) In planta distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology*, 98(5), 592-599.
- Thomson, I. (2004) F. Begum, MN Amin, S. Islam and MAK Azad. *Biotechnology*, 3(1), 56-62.
- Trigiano, R.N. y Gray, D.J. (2011) *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press.
- Trujillo-Arriaga, J. (2010) Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. 2 Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. *Merida, Yucatán. México*.
- Varela, F.S., Orosco, S.M., Torres, A.R. y Silva, A. (2013) Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos, (Ed.) UAT, pp. 428.
- Vila, S. K., Rey, H. Y., & Mroginski, L. A. Establecimiento *in vitro* de explantes y regeneración de plantas de *Melia azedarach* L.
- Vidal, R. y Marco, V. (2014) Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle)-variedad Tahití-a partir de segmentos nodales.
- Villalobos, V. y Engelmann, F. (1995) Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 375-382.
- Villalobos, M. R., de Sierralta, S. L., & Fernández, A. U. (1999). Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16(3).
- Viloria, Z. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Universidad del Zulia, Maracaibo, 35p.
- Vinueza, S. y Wilson, R. (2014) Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.)-variedad Tahití a partir de meristemas axilares.
- Zorz, A. Z., Lezcano, M. I. D., Segnana, L. R. G., & de Ortiz, M. V. (2014). Efecto del carbón activado en el control de la oxidación de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden cultivados *in vitro*. *Investigación Agraria*, 14(2), 107-111.
- Zhang, G., Hong y Hong-hua (2010) Study on Pathogen-removal Shoot-tip Micrografting Technology of *Citrus medica* L. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 2, 014.

ANEXOS

A 1. Plantas hospederas del Psilido asiático, especificadas en la NOM-EM-047-FITO-2009.

| Nombre Científico | Nombre Común | Nombre Científico | Nombre Común |
|---|----------------------|---|---|
| <i>Aeglopsis chevalieri</i> Swingle | | <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | Naranja dulce |
| <i>Atalantia missionis</i> Oliver | | <i>Citrus sunki</i> Hort. ex Tanaka | Mandarino Sunki |
| <i>Balsamocitrus dawei</i> Stapf. | | <i>Citrus taiwanica</i> | Nanshodaidai o taiwanica |
| <i>Bergera (Murraya) koenigii</i> (L.) | Limonaria | <i>Citrus unshiu</i> (Mack.) Marc | Mandarino Satsuma |
| <i>Citrus reticulata</i> X <i>C. paradisi</i> | Tangüelos | <i>Citrus volkameriana</i> | Limón Volkameriana |
| <i>Citrus reticulata</i> X <i>C. sinensis</i> | Tangors | <i>Citrus x limonia</i> Osbeck | Lima Rangpur |
| <i>Calodendrum capensis</i> Thunb. | | <i>Citrus x nobilis</i> Lour. | Mandarino king |
| <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don | | <i>Citrus x nobilis</i> Lour. "Ortanique" | Mandarino Ortanique |
| <i>Citranges (Poncirus X C. sinensis)</i> | Citranges | <i>Citrus x paradisi</i> Macfad. | Toronjo |
| <i>Citrus amblycarpa</i> Ochse | Mandarino Amblycarpa | <i>Clausena indica</i> Oliver | |
| <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle | Limón Mexicano | <i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels | |
| <i>Citrus aurantium</i> L. | Naranja Agrio | <i>Cuscuta australis</i> R. Br. (Convolvulaceae, Cuscutaceae) | Cuscuta |
| <i>Citrus depressa</i> Hayata | | <i>Fortunella</i> spp. | Kumquat |
| <i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck | Pomelo | <i>Limonia acidissima</i> L. | |
| <i>Citrus hassaku</i> Hort. ex Tanaka | | <i>Microcitrus australasica</i> (F.J. Muell.) Swingle | |
| <i>Citrus hystrix</i> DC. | | <i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack | Limonaria |
| <i>Citrus ichangensis</i> Swingle | | <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. | Naranjos trifoliados (Dragón volador, Rubidoux, Rich 16-6, Benecke) |
| <i>Citrus indica</i> Tanaka | | <i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i> | Citrumelos |
| <i>Citrus jambhiri</i> Lushington | Limón Rugoso | <i>Severinia buxifolia</i> Swinglea | Severinia |
| <i>Citrus junos</i> Sieb. ex Tanaka | Yuzu | <i>glutinosa</i> (Blanco) Merr. | |
| <i>Citrus kabuchi</i> Hort. ex Tanaka | | <i>Triphasia trifolia</i> (Burm. f.) P. Wilson | |
| <i>Citrus latifolia</i> Tanaka | Limón Persa | <i>Vepris (Toddalia)</i> | |

| | | |
|--|---------------------------------------|---|
| <i>Citrus limetta</i> Risso | Lima de "chiche" | <i>lanceolata</i> Lam X <i>Citroncirus</i> <i>webberi</i> J. Ingram & H.E. Moore |
| <i>Citrus limettioides</i> | Lima dulce" | |
| <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. | Limón | |
| <i>Citrus macrophylla</i> | Limón Macrofila | |
| <i>Citrus macroptera</i> Montrons | | |
| <i>Citrus madurensis</i> (= X <i>Citrofortunella microparpa</i>) | Calamondin | |
| <i>Citrus maxima</i> | Pomelo / shaddock | |
| <i>Citrus medica</i> | Cidro | |
| <i>Citrus myrtifolia</i> | Naranja hoja de mirto | |
| <i>Citrus oto Hort.</i> ex Tanaka | | |
| <i>Citrus reshni</i> | Mandarino Cleopatra | |
| <i>Citrus reticulata</i> Blanco | Mandarinos comunes y tangerinos | |
