

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



REGENERACION *in vitro* DE NARANJO AGRIO  
( *Citrus aurantium* Linn. )

TESIS

como requisito parcial para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Presenta:

Ing. Juan Vega Pérez

San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Enero de 1997



1080080882

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**REGENERACION *in vitro* DE NARANJO AGRIO  
(*Citrus aurantium* Linn.)**

**T E S I S**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

**PRESENTA**

**ING. JUAN VEGA PEREZ**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON, ENERO DE 1997.**

TM  
SB369  
V4  
11



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"Regeneración *"in-vitro"* de naranjo agrio  
(*Citrus aurantium* Linn.)."

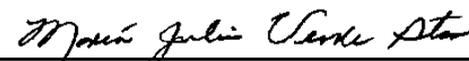
T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

ING. JUAN VEGA PEREZ

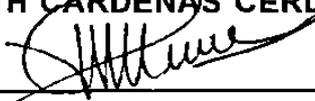
COMITE DE TESIS

PRESIDENTE:   
DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR

SECRETARIO:   
DRA. HILDA GAMEZ GONZALEZ

1º VOCAL:   
M.C. AZUCENA ORANDAY CARDENAS

2º VOCAL:   
DRA. ELIZABETH CARDENAS CERDA

3º VOCAL:   
M.C. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON, ENERO DE 1997.

## A MIS PADRES

*Jose Guadalupe Vega Garcia*

*Angélica Perez Martinez*

## A MIS HERMANOS

## A MI FAMILIA

*Martha Imelda*

*Juan Damian*

*Edgar Adrian*

*Sandra Dinorah*

*Ana Karen*

## A MIS MAESTROS DE POSTGRADO

## AGRADECIMIENTOS

A Usted, Dra. María Julia Verde Star asesor principal, por su valiosa colaboración y por su incondicional apoyo en mi formación de postgrado, por sus muestras de afecto y comprensión.

A Usted, Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda por que con sus enseñanzas de biotecnología vegetal hizo posible realizar este trabajo.

A todos mis profesores del programa de graduados, muy en especial a la M.C. Azucena Oranday Cárdenas, por compartir sus experiencias y conocimientos, por su apoyo moral brindado.

A la Dra. Hilda Gámez González y al M.C. Roberto Mercado Hernández, por su acertada participación en la revisión del presente trabajo.

Gracias, a todos.

Dedico en especial este pequeño trabajo a aquellos maestros e investigadores que convencidos apuestan su resto a la utilización de tecnologías no convencionales que creen en su proyecto sin perder la capacidad de asombro ante el vertiginoso avance de la tecnología

## INDICE

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	VIII
CLAVE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
Origen de los cítricos.....	4
Distribución de los cítricos.....	4
Familia de las Rutáceas.....	5
Estado actual de la citricultura.....	6
El portainjerto naranjo agrio.....	7
Clasificación taxonómica de <u>C. aurantium</u> L.....	8
Características botánicas del género <i>Citrus</i> .....	9
Problemática de <u>C. aurantium</u> L.....	9
El VTC y su impacto en la citricultura.....	10
Sintomatología del VTC.....	12
Propagación.....	14
Antecedentes del VTC en México.....	15
Alternativas de control.....	15
Saneamiento de cultivares.....	15
Uso de patrones tolerantes.....	17
Protección cruzada.....	18
Fitomejoramiento <i>in vitro</i> .....	19
El cultivo de tejidos.....	21

Función de los reguladores de crecimiento.....	23
Cultivo de tejidos en cítricos.....	23
Micropropagación de cítricos.....	25
Embriogénesis somática.....	26
Justificación.....	27
III. HIPOTESIS.....	28
IV. OBJETIVOS.....	28
V. MATERIALES Y METODOLOGIA.....	29
Material vegetativo.....	29
Germinación aséptica.....	29
Regeneración de brotes.....	30
Regeneración de raíz.....	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
Regeneración de brotes.....	33
Regeneración de raíz.....	34
Perspectivas de fitomejoramiento.....	37
VII. CONCLUSIONES.....	38
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	41
IX. APENDICE.....	45

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Fig. A).- Germinación aséptica de <i>C aurantium</i> L.....	39
Fig. B).- Selección de la fuente de inóculo.....	39
Fig. C).- Cultivo en cámara bioclimática.....	39
Fig. D).- Primordios meristemáticos a 15 días de cultivo.....	39
Fig. E).- Brotes múltiples con presencia de callo.....	39
Fig. F).- Elongación de brotes en medio M.S.(50%).....	39
Fig. G).- Fuente de inóculo para la rizogénesis.....	40
Fig. H).- Enraizamiento de brotes a 8 semanas de cultivo.....	40
Fig. I).- Inóculos no enraizados.....	40
Cuadro A).- Composición del medio Murashige-Skoog.....	46
Cuadro B).- Composición del complejo B5 de Gamborg.....	46
Cuadro C).- Combinación de tratamientos BA-AIB, para la brotación adventicia.....	47
Cuadro D).- Combinación de tratamientos ANA-AIB, para la rizogénesis.....	47
Cuadro E).- Análisis de varianza de las medias de brotación.....	48
Cuadro F).- Tolerancia a enfermedades de algunos portainjertos.....	48
Cuadro G).- Tolerancia a salinidad y tipo de suelo.....	49
Cuadro H).- Tolerancia a salinidad y tipo de suelo.....	49
Cuadro I).- Efecto del patrón sobre el cultivar.....	50
Cuadro J).- Efecto del patrón sobre el cultivar.....	50
Cuadro K).- Efecto del patrón sobre la producción.....	51
Cuadro L).- Efecto del patrón sobre la calidad de la fruta.....	51

## CLAVE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.

VTC = virus de la tristeza de los cítricos

RIAC = Red Interamericana de Cítricos

mdd = millones de dólares

ton = toneladas

ha = hectárea

nm = nanómetro

DNA = ácido desoxiribonucleico

RNA = ácido ribonucleico

°C = grados celsius

Bt = Bacillus thuringiensis

lb.in<sup>-2</sup> = libras por pulgada cuadrada

BA = bencilaminopurina

AIB = ácido indolbutírico

ANA = ácido naftalenacético

B5 = vitaminas del medio Gamborg

mg.l<sup>-1</sup> = miligramos por litro

cm = centímetro

M.S. = medio Murashige-Skoog

## RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló la metodología para la regeneración *in vitro* de naranjo agrio (*C. aurantium* Linn.), a partir de la organogénesis directa

Se utilizó como fuente de inóculo los hipocotilos etiolados provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, a partir de semillas obtenidas de un mismo árbol, de la colección de variedades del Centro Experimental Citrícola Francisco Villa de Guémez Tam.

El experimento para la regeneración de brotes consistió de 36 tratamientos y 5 repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. Los inóculos disectados se colocaron en los tratamientos con el medio basal de Murashige-Skoog, suplementado con 30 gr.l<sup>-1</sup> de sacarosa, las vitaminas del medio B5, pH 5.7 y 7.5gr/L de agar. Los reguladores de crecimiento utilizados fueron BA y AIB, y las concentraciones estudiadas en mg.l<sup>-1</sup> fueron: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 respectivamente. El experimento se realizó en cámara bioclimática a 27 ± 2°C, con un fotoperíodo de 3000 lux de 16:8 h (luz:oscuridad). El parámetro a evaluar fué el número de brotes por explante. El análisis de varianza de las medias de brotación entre tratamientos indicó que existe significancia a una probabilidad del 99%, la prueba de Tukey indicó que al menos existen 3 grupos distintos estadísticamente, siendo el mejor tratamiento el #17 (0.8 mg.l<sup>-1</sup> BA:0.2 mg.l<sup>-1</sup> AIB) con una media de 10.2 brotes.

Para la regeneración de raíz se realizaron 2 experimentos, consistiendo c/u de 36 tratamientos combinados con 3 repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. Los reguladores de crecimiento utilizados fueron ANA y AIB y las concentraciones estudiadas en mg.l<sup>-1</sup> fueron: 0,0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 respectivamente, en el medio basal MS suplementado con 30 gr.l<sup>-1</sup> de sacarosa, las vitaminas del medio B5, pH 5.7 y 7.5 gr de agar. El parámetro evaluado fué la formación de raíz con raicillas secundarias en el inóculo. Ambos experimentos se mantuvieron en cámara bioclimática a 27°C ± 2°C con un fotoperíodo (3000 lux) de 16:8 h (luz:oscuridad). El experimento que utilizó como fuente de inóculo los brotes regenerados del hipocotilo, mostraron diferencia significativa al 95% de probabilidad cuando fué analizado con la prueba de Q de Cochran con Q=6, p<0.05, siendo el mejor tratamiento el número 24 (1.0 mg.l<sup>-1</sup> ANA:0.6 mg.l<sup>-1</sup> AIB), mientras que en el experimento que utilizó hipocotilos etiolados como fuente de inóculo, ningún tratamiento mostró formación de raíz.

## INTRODUCCION

A nivel mundial la citricultura ha experimentado en las últimas dos décadas, importantes aumentos en la producción e industrialización de cítricos. Se considera uno de los mayores sectores agroalimentarios del mundo. Su importancia para los países en desarrollo la subraya el hecho de que estos efectúan mas de la mitad de las exportaciones mundiales totales.

Nuestro país ocupa el sexto lugar mundial en producción, proporcionando fruta para consumo local y para exportación, representando una importante actividad económica que genera fuentes de empleo y entrada de divisas.

Sin embargo, las enfermedades de los cítricos causadas por virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos que ocasionan una disminución en el vigor, productividad y longevidad de la planta, representan una grave limitante para la citricultura mexicana, produciendo graves pérdidas económicas.

Tradicionalmente, el naranjo agrio (*Citrus aurantium* Linn.) ha sido considerado como uno de los mejores portainjertos de cultivares comerciales de cítricos, debido principalmente a su adaptación a distintas condiciones edafoclimáticas, tolerancia a algunas enfermedades importantes y porque da a la fruta un buen tamaño y calidad para su comercialización e industrialización.

La principal desventaja que presenta este portainjerto es su susceptibilidad al virus de la tristeza de los cítricos (VTC).

La tristeza de los cítricos es considerada una de las enfermedades virales de mayor importancia en el cultivo de los cítricos, especialmente cuando se ha utilizado el naranjo agrio como portainjerto. En México, casi la totalidad de las plantaciones de los cítricos se encuentran injertadas sobre este portainjerto.

El movimiento gradual mostrado por el principal vector del VTC, *Toxoptera citricidus*, desde Sudamérica hacia el norte del continente, la falta de programas extensivos en nuestro país para la utilización alterna de portainjertos tolerantes, así como, de programas de investigación orientados a conseguir soluciones para el control de la enfermedad, indica, que la presencia del VTC en México puede ser un grave problema si no se aplican estrategias técnico-científicas para su prevención y control.

Actualmente la biotecnología vegetal, mediante técnicas de mejoramiento genético *in vitro*, ha permitido la producción de vegetales con mejor vigor genético y resistencia a plagas y enfermedades. El éxito de las recientes tecnologías para la manipulación genética de vegetales por transferencia directa e indirecta de ADN permite tener una alternativa en la solución de problemas de la citricultura moderna a mediano plazo, en especial la obtención de cítricos con tolerancia al virus de la tristeza.

- El uso de sistemas *in vitro* como alternativa a las técnicas de

propagación, saneamiento y fitomejoramiento convencional ha tenido gran impacto en cultivos tropicales, principalmente por las ventajas de la manipulación del material vegetativo bajo condiciones controladas en espacios reducidos y por lograr las metas en mas corto tiempo.

En cítricos, mediante estas técnicas se ha tenido éxito en la obtención de plantas nucelares derivadas de la embriogénesis somática a partir del cultivo de óvulos; en la obtención de cultivares libres de enfermedades mediante el cultivo de meristemas; en la selección *in vitro* de variedades tolerantes a la salinidad, así como, en el aislamiento y fusión de protoplastos para la obtención de híbridos.

La utilización de las técnicas de manipulación genética, mantiene como requisito indispensable contar con una apropiada técnica de cultivo de tejidos, que permita la regeneración del material vegetativo utilizado como fuente de explante y que a la vez mantenga su estabilidad genética. Por lo que, bajo la hipótesis de que la utilización de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo conducirá a la regeneración *in vitro* del inóculo de C. aurantium L. se plantearon los objetivos de este trabajo.

## LITERATURA REVISADA

### **Origen de los cítricos.**

El cultivo de los agrios se confunde con la historia de las antiguas civilizaciones que los cultivaron primero por sus perfumes y mas tarde por sus frutos. Es con el esplendor de las civilizaciones china e hindú cuando el cultivo inicia su propagación, durante el primer milenio antes de nuestra era, por todos los países del sur-este asiático, sur de Japón y archipiélago de Malasia (Praloran 1977).

En los albores del año 1400 d.c., después de los viajes de Marco Polo a China, los portugueses introdujeron el naranjo en el Mediterráneo. Es a partir de esta cuenca que los navegantes árabes los propagaron por las costas orientales de Africa hasta Mozambique. Cristóbal Colón en su segundo viaje en 1493 los introdujo a Haití de donde llegó a México por Veracruz en 1518 y después a Estados Unidos; Florida 1565, en Carolina del Sur y Georgia en 1577, en Arizona desde 1701 en California en 1767 y finalmente en Texas hacia 1890. En Perú se establecieron en 1609, en Australia en 1788 y finalmente los navegantes anglo-holandeses los introdujeron en la provincia del Cabo, en Africa del Sur (Loussert, 1990).

### **Distribución de los cítricos.**

Los cítricos son ampliamente cultivados en todo el mundo desde el ecuador hasta los 41 grados de latitud norte y sur. El centro de su origen es

incierto, sin embargo, recientes análisis genéticos sugieren que los diferentes cultivares de cítrico clasificados, son aparentemente resultado de la hibridación natural entre 3 especies verdaderas de *Eucitrus*: el cidro (*Citrus medica*); la mandarina (*C. reticulata*) y el pomelo (*C. grandis*) (Bar-Joseph, et.al. 1989).

### **Familia de las Rutáceas.**

La familia de las Rutáceas, a la que pertenecen los agrios comprende, entre otros, los tres géneros siguientes: *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus*.

El género *Poncirus* está formado por una sola especie: el *Poncirus trifoliata*. Esta especie es esencialmente utilizada en citricultura como portainjertos; sus frutos no son comestibles.

El género *Fortunella* comprende seis especies de entre las que solamente dos son objeto de cultivo; se trata de *Fortunella japonica* y *Fortunella margarita*. Los frutos producidos por las especies del género *Fortunella* son conocidos para su consumo con el nombre de kumquats y sirven para la fabricación de confituras.

El género *Citrus* constituye, con sus 145 especies el género más importante. En él se encuentran las principales especies cultivadas, que son: Naranjas (*C. sinensis*), Mandarinas (*C. reticulata*), Clementinas (*C. clementina*), Limones (*C. limon*), Pomelos (*C. paradisi*), Cidros (*C. medica*), Naranja amarga (*C. aurantium*), Satsuma (*C. unhsiu*) similar a la mandarina, Limas (*C. aurantifolia*) (Loussert, 1990).

## **Estado actual de la citricultura.**

La producción mundial de cítricos ha experimentado en los últimos veinte años un importante aumento, pasando de 45 millones de ton. a principios de los años 70, a los 75.2 millones de ton. en la campaña agrícola de 1993-1994. En este mismo período, México obtuvo una producción de 3.65 millones de ton., ocupando el sexto lugar global. (RIAC-FAO, 1995), mientras, la industrialización de frutas (zumos) en los últimos 15 años ha crecido desde 1000 mdd E.U.A. hasta la estimación de 1992 de 5200 mdd E.U.A. (Kortbech-Olsen, 1993).

La superficie nacional plantada de cítricos (aprox. 360,700 ha.) ha observado un incremento del 50% en el período de 1980-1988, aumentando en el noreste un 4.3%, la península de Yucatán 167.6%, la costa del pacífico 20.9% y el noroeste 44.9 % (López, 1994).

Destacan por su importancia en superficie cultivada los estados de Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas, Colima, Yucatán, Campeche, Sinaloa, Sonora y San Luis Potosí. La naranja es la de mayor importancia por superficie cultivada 257,600 ha. con un volúmen de producción de 2,800,000 ton/año, siguiendole el limón, toronja y mandarina con 90,300 ha. de sup. y 844,000 ton/año; 6,600 ha. de sup. y 100,00 ton/año; 6,200 ha. de sup. y 90,000 ton/año respectivamente (Gutiérrez, 1994).

Las áreas de producción en Tamaulipas (aprox. 35,420 ha.) se encuentran distribuidas principalmente en los municipios de la zona centro

del estado, contando la mayoría de la superficie cultivada con plantaciones de naranja valencia. Las plantaciones se encuentran injertadas casi en su totalidad sobre patrón de naranjo agrio (*Citrus aurantium* Linn.). No obstante las ventajas agronómicas que representa el empleo de este portainjerto, es extremadamente susceptible al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) (S.D.A.F.P., 1994).

### **EL Portainjerto naranjo agrio ( *Citrus aurantium* Linn.)**

Los cítricos fueron cultivados por alrededor de 2 milenios en su propio sistema radical, hasta que en el siglo XIX una epidémica pudrición de la raíz causada por *Phytophthora sp.* destruyó los árboles de naranjo dulce y forzó al uso del naranjo agrio (*C. aurantium* Linn.) como portainjerto por su tolerancia a esta enfermedad (Bar-Joseph, *et.al.* 1989).

El uso de portainjertos tiene una gran importancia en la citricultura, ya que al formar parte del árbol y constituir de hecho su sistema radical, realiza todas las funciones inherentes a ese órgano.

Aunque el cultivar determina las características hortícolas fundamentales, el portainjerto influye notablemente sobre el comportamiento del árbol, su productividad y patología (Gómez, *et. al.* 1996).

El naranjo agrio (*C. aurantium*), es uno de los portainjertos más importantes a nivel mundial en zonas donde la tristeza de los cítricos no existe. Induce vigor moderado con buena productividad y frutos de gran calidad. No solo da al fruto un alto contenido de azúcar y niveles de acidez,

sino que permite su mantenimiento durante períodos más largos que otros portainjertos sin que se produzca pérdida de sus condiciones comerciales. El tamaño del fruto es bueno como también lo es el contenido en ácido ascórbico. Es más tolerante a la salinidad, sequía y gomosis y tiene buen comportamiento sobre suelos calizos, sin embargo, no tiene buena productividad en suelos arenosos. Junto con el *Poncirus trifoliata* y el *Swingle citrumelo*, induce al cultivar la mejor resistencia al frío. Tiene baja insidencia al *Blight* y no se ve afectado por *exocortis* y *xiloporosis*, sin embargo, es susceptible a nemátodos (Saunt, 1991).

Los factores más importantes sobre los que influye el patrón se muestran en los cuadros F-K incluídos en el apéndice.

**Clasificación Taxonómica de *C. aurantium* Linn. (Agusti y Almela, 1991).**

- División.....Espermatofitas
- Subdivisión.....Angiospermas
- Clase.....Dicotiledóneas
- Subclase.....Archiclamídeas
- Orden.....Geraniales
- Suborden 1.....Geraninas
- Familia.....Rutáceas
- Subfamilia.....Aurantioideas
- Tribu (2).....Cítreas
- Subtribu (6).....Citrinas
- Género.....Citrus
- Especie.....aurantium

## Características botánicas del género *Citrus*

Los árboles del género *Citrus* son de tamaño medio forma globosa y ramas regulares los brotes son flexibles con entrenudos de 5-7 cm de longitud limitados por una hoja de cada extremo y en cuya axila se localizan varias yemas y una espina mas o menos grande y consistente segun la especie y variedad Las hojas son lanceoladas de tamaño medio con su base ancha y convexa (excepto en la mandarina Satsuma que es concava) con peciolo alado y articulado en su union al brote y al limbo Las flores hermafroditas se localizan aisladas en racimos o sobre brotes con hojas del mismo año la presencia de estas estructuras junto con las exclusivamente vegetativas ha permitido su clasificacion en 5 tipos de brotes segun el numero de flores y hojas que presentan caliz con 5 sepalos corola con 5 petalos blancos y entre 20 y 25 estambres soldados, con polen no siempre fertil y en ocasiones autoincompatible ovario subgloboso con 8-12 loculos estilo delgado alto claramente delimitado y estigma globoso y pegajoso Fruto en hesperidio globoso, oval o ligeramente ovoide de piel delgada superficie fina y cerosa y de color anaranjado (mandarinas y naranjas) o amarillo (limones y pomelos) de tamaño pequeño (mandarinas) a grande (pomelos) y con notables diferencias en su acidez y contenido de azucares vitaminas etc segun la especie y variedad (Agusti y Almela 1991)

### Problemática de C aurantium Linn

El naranjo agrio (C aurantium Linn ) es extremadamente sensible al virus de la tristeza de los citricos (VTC) cuando se le injerta como copa

cualquier cultivar de naranjo, pomelo o mandarino, debido a que estas especies multiplican el virus en su copa, produciendo la muerte de la planta a corto o largo plazo, por lo que es solo recomendable para usarse en combinación con limoneros (Palacios, 1978 ).

## **El VTC y su impacto en la citricultura.**

La Tristeza de los cítricos es el nombre en Portugués dado a un declinamiento gradual de los árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), toronjas (*C. paradisi* Macf.) y mandarinas (*C. reticulata* Blanco) injertadas sobre naranjo agrio (*C. aurantium* L.), Moreira, citado por González y Rocha (1984).

Esta enfermedad es de distribución mundial y se considera la afección viral más destructiva que se conoce en el caso de los cítricos. En años recientes se ha incrementado notablemente el reporte de árboles infectados por VTC en Centro América y las Islas del Caribe, así como, la presencia de razas severas del virus en algunas localidades. Lo anterior, aunado al establecimiento de su vector más eficiente, el áfido (pulgón) café de los cítricos, en la mayoría de las Islas del Caribe, crea una preocupante situación para el futuro de la citricultura de los países de esa área geográfica (Ochoa, 1994).

El patógeno es un virus flexible y filamentoso de peso molecular de  $6.5 \times 10^6$  daltons y 20 kilobases, mide aproximadamente  $11 \times 2,000$  nm y está constituido por una molécula de RNA de simple cadena. Pertenece al grupo

de los closterovirus (Bar-Joseph, 1989)

El virus esta limitado al floema y es transmitido por áfidos de una manera semipersistente, infectando la mayoría de las especies, variedades e híbridos intergenéricos e interespecíficos de los cítricos (Ochoa-Corona, 1989)

La primer epidemia seria que causó el declinamiento de un gran número de plantaciones de naranja dulce injertada en C. aurantium fue registrada en 1930 en Argentina, considerandose entonces como una enfermedad de la raíz. En 1937, la enfermedad apareció en Brasil donde adoptó el nombre de *tristeza*. En Africa, en The Gold Coast (hoy Ghana), apareció como una muerte regresiva ("dieback") en plantaciones de limas agrias en 1938 y al siguiente año se manifestó como una pérdida rápida ("quick-decline") en California (Bar-Joseph, 1989).

Se ha estimado que la tristeza causó la muerte de varias decenas de millones de árboles injertados en naranjo agrio, entre los años de 1930-1980 en varios países de América del Sur, Estados Unidos (California y Florida), Israel y España. En la década de 1980-1990 causó la muerte a más de 6 millones de árboles en Venezuela, Colombia y Perú (Lastra, *et. al.* 1991).

Solo en Venezuela como ejemplo, el virus fué detectado en 1960 y en 1980 cuando se presentó el primer brote epifitótico por tristeza, 4 años después de haberse detectado el establecimiento del insecto vector, causó el colapso de la citricultura nacional con la destrucción de 33,000 ha de

plantas injertadas en naranjo agrio, sumandose a ello la carencia de material de propagación libre de virus, la proliferación de viveros sin control fitosanitario y diseminándose razas severas de VTC, *exocortis*, *cachexia* a través de plantas de vivero. Tal cronología constituye un punto de reflexión para enfrentar las tomas de decisión con agilidad y profesionalismo cuando se presenten circunstancias similares (Ochoa-Corona, 1994).

### **Sintomatología del VTC en árboles sobre naranjo agrio.**

La enfermedad afecta los vasos conductores del floema de la planta taponeándolos y necrosándolos, impidiendo así el paso de nutrimentos a la raíz por lo cual el árbol muere por inanición, esto provoca síntomas de marchitez en el follaje, epinastia y clorosis de hojas nuevas y maduras, reducción del crecimiento del árbol, carencia de brotes nuevos y bajos rendimientos en la producción hasta presentarse la marchitez y el colapso total del árbol, Walce (1978) citado por González y Rocha (1984).

Los síntomas de tristeza en árboles afectados se pueden presentar en árboles injertados sobre naranjo agrio y aquellos producidos por razas virulentas severas en cultivares injertados sobre patrones tolerantes (Lee y Rocha, 1992).

Un síntoma específico de tristeza es el efecto de "panal", que son pequeños orificios apiñados, no visibles a simple vista, pero que pueden distinguirse muy fácilmente con un lente de aumento. Se produce en la corteza interior de las cepas de naranjo agrio, debajo de la unión de la yema

(Pratt, 1984).

En condiciones de campo se pueden distinguir tres tipos de comportamiento en árboles infectados por tristeza:

1.- Colapso rápido: Los árboles aparentemente sanos comienzan a mostrar en sus hojas un marchitamiento similar al de falta de agua a pesar de disponer en abundancia en el suelo. Estos árboles mueren en una o dos semanas quedando totalmente secos con hojas y frutos colgando de la rama.

2.- Decaimiento lento.- Los árboles afectados cambian de color verde intenso del follaje a un verde claro seguido de un amarillamiento general. Se produce una defoliación importante y una muerte progresiva de raicillas. El árbol pierde vigor y las escasas brotaciones se presentan en ramas gruesas, por lo que el volúmen de la copa se reduce progresivamente. Los frutos producidos son de tamaño pequeño y amarillean prematuramente, aunque la coloración final en la madurez es más pálida que en la normal.

3.- Árboles sin decaimiento.- En ocasiones se observan árboles infectados que no muestran síntomas de la enfermedad en el follaje y frutos, estos árboles tienen con frecuencia un tamaño inferior, a los árboles sanos y presentan hinchazón del tronco de la variedad y de punteaduras de la corteza del patrón de naranjo agrio a la línea del injerto. No obstante pueden encontrarse árboles infectados con aspecto y desarrollo normal. Las causas de esta ausencia de síntomas son desconocidas y pueden ser debidas a la presencia de razas de virus muy débiles o a condiciones ambientales que dificulten la expresión de síntomas (Moreno *et al.*, 1983).

## Propagación.

El pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricidus* Kirkaldi), además de ser una plaga importante, es el principal vector del virus de la tristeza, incluyendo las razas agresivas, que ocasionan el picado del tallo y amarillamiento de las plantas, (Roistacher y Bar Joseph, 1987).

Su transmisión en el campo se efectúa además por injerto de material infectado y mecánicamente aunque en muy baja probabilidad (I.I.C.F., 1992).

El vector ha mostrado un desplazamiento gradual desde Sudamérica hacia el norte, encontrándose ya presente en áreas cítricas de América Central y del Caribe (Lee y Rocha 1992).

El grado de eficiencia en la diseminación varía con las especies de pulgones, razas del virus y plantas hospederas. También se ha demostrado que el virus puede ser transmitido por (*Cuscuta sp*), la cual es una planta parásita de los árboles de cítrico (Moreno *et al.*, 1983).

Otras especies de áfidos que pueden transmitir el virus aunque con una eficiencia de transmisión más baja son el pulgón verde de los cítricos (*Aphis citricola* Vander Goot.) y el pulgón negro de los cítricos (*Toxoptera aurantii* Fonsc.). El virus también puede ser transmitido por (*Aphis spirecola* Patch), (*Aphis caraccivora* Kock), (*Myzus persicae* Sulz) y (*Dactinotus jaceae* L.), aunque en menor escala (Klotz, 1973).

## **Antecedentes del VTC en México.**

En México en 1984, se monitorearon los 6 bancos de germoplasma de cítricos y fueron detectados dos materiales genéticos infectados con VTC en el estado de Tamaulipas (González y Vela, 1984). Recientemente se ha detectado el VTC en muestras de viveros procedentes de Tlapacoyan y Martínez de la Torre Veracruz, lo cual indica una alta posibilidad de que focos adicionales de infección puedan estar presentes en otras áreas citricolas del país, al utilizar plantas procedentes de esos viveros (López 1994).

## **Alternativas de control.**

Las medidas del control para la tristeza de los cítricos se pueden clasificar en directas e indirectas. Las directas consisten en evitar la entrada de la enfermedad en una área o país libre de la misma (cuarentena) ó suprimir los árboles infectados para evitar o frenar su difusión (erradicación). Los métodos indirectos consisten en convivir con la tristeza evitando los daños producidos mediante el uso de patrones tolerantes, utilizando cultivares saneados, la protección cruzada y el fitomejoramiento (Moreno *et al.*, 1983).

## **Saneamiento de cultivares.**

La necesidad de contar con material vegetativo de cítricos certificado, libre de enfermedades es básico para el establecimiento de plantaciones y

replantaciones de cítricos. La presencia de virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos en el material propagativo deteriora la sobrevivencia del árbol y la producción de fruta.

Las enfermedades producidas son un factor importante en la productividad de cualquier cultivar. La disminución del vigor, rendimiento y calidad de la producción es el resultado comparativo con la productividad de cultivares sanos. Afortunadamente mediante la termoterapia se ha obtenido una alternativa exitosa de saneamiento de cultivares infectados (Roistacher, 1977).

Con el propósito de obtener plantas libres de enfermedades de origen viral mediante el cultivo *in vitro*, se ha desarrollado la técnica de microinjerto de ápices de cultivares de cítrico de importancia comercial. Para realizar la técnica de microinjerto es necesario disponer de portainjertos logrados por germinación aséptica y de una fuente de brotes del cultivar a sanear. Teóricamente cualquier patrón que sea compatible con la variedad que sobre él se injerte puede ser usado para el microinjerto, sin embargo, atendiendo a que es más fácil distinguir en la identificación de los rebrotes del patrón y ser eliminados, se han utilizado los patrones trifoliados. El proceso consiste en aislar los ápices caulinares en condiciones asépticas y con el auxilio de un estereomicroscopio se coloca en la superficie del corte transversal practicado al decapitar el portainjerto.

Se ha demostrado que aunque se logra mayor prendimiento del microinjerto con el empleo de ápices caulinares mayores, existe una relación inversa entre el tamaño de éstos y el porcentaje de plantas sanas obtenidas (Navarro *et al.*, 1975).

Las principales virosis de los cítricos como *tristeza*, *exocortis*, *cachexia*, *stubborn*, *infection variegation* y *vein enation* pueden ser eliminadas en un 100% a través del microinjerto. Son difíciles de eliminar con esta técnica *tatter leaf*, *dweet mottle*, *psorosis*, *goma cóncava*, *crisacortis* e *impietratura*. Sin embargo, si se aumenta la temperatura a la que se desarrollan los brotes hasta 32° C, se elevan considerablemente los porcentajes de plantas sanas obtenidas por esta vía (Mas, 1995).

### **Uso de patrones tolerantes.**

La utilización de portainjertos tolerantes como medida de combate a la tristeza de los cítricos es necesaria, pero no suficiente en países en los que existen razas virulentas de la tristeza capaces de causar daños directos en las variedades injertadas sobre los patrones tolerantes (Moreno *et al.*, 1983).

El posible uso de portainjertos tolerantes como alternativa al naranjo agrío implica evaluar su comportamiento en distintas zonas agroclimáticas, proceso que lleva por lo menos 10 años de duración.

Desafortunadamente todos los patrones tolerantes a tristeza son severamente afectados por el *Citrus Blight*. La incidencia y severidad de esta enfermedad en el campo depende de la predominancia de patrones susceptibles. En Florida donde todavía existen plantaciones sobre naranjo agrío, aún en presencia de tristeza, se ha observado que la ocurrencia y los daños causados por *Citrus Blight*, son menores en árboles injertados en este portainjerto (CAEGET, 1992).

En Venezuela, no obstante el empleo de portainjertos distintos al naranjo agrio para permitir el resurgimiento de la citricultura después del primer brote epifitótico del VTC, el problema no ha sido solucionado completamente debido al surgimiento de razas de VTC del tipo picado del tallo, las cuales causan debilitamiento y baja producción de árboles injertados sobre patrones tolerantes. Por otra parte, el cambio de patrones sin tomar precauciones de utilizar material de propagación saneado, ha propiciado que enfermedades viroidales, tal como la *exocortis* y *cachexia*, micoplasmas, así como, problemas relacionados con pudriciones radiculares por *Phytophthora spp*, hayan comenzado a manifestarse debido a la tolerancia ofrecida por el naranjo agrio, el cual oculta su presencia. Lo anterior complica el panorama para aquellas especies susceptibles al VTC aún injertadas sobre portainjertos tolerantes (Ochoa-Corona *et al.*, 1994).

### **Protección cruzada.**

Otra de las medidas que ha mostrado cierta efectividad para el combate de la tristeza es la protección de las diferentes variedades de cítricos con cepas benignas del VTC (protección cruzada). Esta medida de control se ha practicado en Brasil, donde ha tenido una gran aceptación por parte de los productores de cítricos, (Costa y Muller, citados por González y Vela, 1984).

En Venezuela, la inoculación de VTC en 4 cultivares de cítrico: lima mexicana, limón Eureka, naranjo agrio y toronja Marsh, donde las cepas fueron tanto débiles como severas, se observó que después de 18 meses,

las inoculadas con razas severas algunas murieron y otras presentaron declinamiento severo, mientras que las inoculadas con razas débiles mostraron un crecimiento similar al testigo, aún dando positiva la prueba con el anticuerpo monoclonal, indicando los resultados la coexistencia del VTC con las especies cítricas susceptibles (Ochoa *et al.* 1995).

### **Fitomejoramiento *in vitro***

La Biotecnología a través de técnicas específicas tales como el cultivo de tejidos, células y órganos, la fusión de protoplastos, la del ADN recombinante y otras, representan una atractiva estrategia al proporcionar un alto grado de oportunidades en la solución de problemas de la agricultura moderna (FAO, 1989).

El desarrollo de cultivos transgénicos ha tenido notorio avance en la última década; solo en los Estados Unidos, el Departamento de Agricultura (USDA) desde 1987 a la fecha ha aprobado alrededor de 850 aplicaciones y notificaciones autorizando cerca de 2000 campos de prueba para plantas transgénicas (Mellon y Rissler, 1995).

Los principales aspectos manejados en el mejoramiento de vegetales por ingeniería genética son en orden de importancia: tolerancia a herbicidas, mejora de la calidad, resistencia a virus, resistencia a insectos, genes marcadores, resistencia a hongos, resistencia a bacterias, etc.

La resistencia mediada por la proteína de cubierta viral, describe resistencia a infección viral y/o desarrollo de enfermedades en plantas

transgénicas que expresan un gen que codifica para la proteína de cubierta viral.

Los requisitos para lograr este propósito son conocer la estructura y secuencia viral, la capacidad de aislamiento del gen viral y la capacidad de construir un gen quimérico que, cuando se introduzca en el tejido vegetal se exprese a suficiente nivel, que permita conferir resistencia a la enfermedad (Chet, 1994).

Un ejemplo claro demostrativo de protección múltiple vía ingeniería genética, lo muestra el reporte de producción de plantas transgénicas de tabaco, donde, plantas transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* A12 con el vector de expresión recombinante pE14, conteniendo el gen que codifica para la proteína de cubierta del virus mosaico de la calabaza (CMV-CP) y un gene modificado que codifica para la producción de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, expresaron el CMV-CP y la toxina de *Bt* cuando se alimentaron a larvas de *Manduca sexta* con el material transformado (Xiao-You *et al.*, 1994).

Las más exitosas técnicas de transferencia de genes para dicotiledóneas hasta ahora han sido difícilmente aplicables a cereales de importancia agrícola, esto debido a la limitada susceptibilidad a infección por *A. tumefaciens*. Otra dificultad importante es la regeneración de plantas fértiles provenientes de protoplastos (Potrykus, 1990).

Sin embargo, mediante la biolística, una técnica directa de transformación, se ha logrado recientemente obtener plantas transgénicas

de maíz, arroz, sorgo, soya, patatas y tabaco, entre otras (Cao, *et al.*, 1990; Hago, *et al.*, 1991; Mc Cabe, *et al.*, 1988; Genga, *et al.*, 1991; Arago, *et al.*, 1992; Prakash y Vaaradarajan, 1992; Kanevski, *et al.*, 1992).

La utilización de las técnicas de manipulación genética mantiene como requisito indispensable contar con una apropiada técnica de cultivo de tejidos que permita la regeneración del material vegetativo utilizado como fuente de explante y que mantenga su estabilidad genética (Sorvari *et al.*, 1993).

### **Cultivo de tejidos.**

La regeneración de plantas *in vitro* a partir de células somáticas ha despertado un interés extensivo entre los mejoradores de plantas y biólogos moleculares (Sorvari 1993).

Durante las últimas décadas, las técnicas para cultivar células, tejidos y órganos vegetales *in vitro* ha tenido un enorme desarrollo que permite aplicarlas a prácticamente todas las especies. Estas técnicas han dado lugar a un gran avance en el conocimiento básico de la biología de las plantas (Hussey 1984).

Los cultivos *in vitro* ofrecen las siguientes ventajas experimentales por cuanto es posible: a) variar de manera controlada las condiciones físicas y químicas para observar respuestas a nivel bioquímico y fisiológico; b) obtener clones genéticamente homogéneos de una cierta característica; c)

en el tubo de ensaye cada célula aislada es un organismo experimental y, a diferencia de las células animales cultivadas *in vitro*, las células somáticas de las plantas pueden volver a diferenciarse e iniciar un desarrollo organizado, que dará como resultado, la formación de nuevos individuos completos y fértiles; esta capacidad de organogénesis o embriogénesis somática significa que las células vegetales, en el tubo de ensaye, pueden ser manipuladas genéticamente de manera semejante a los microorganismos y obtener resultados en plantas completas; d) Se pueden manipular millones de células y analizar un gran número de condiciones experimentales en un espacio relativamente reducido y en un tiempo mucho menor que el que se requeriría si los experimentos se llevaran a cabo con plantas completas en un invernadero o campo de experimentación (Kochba, 1977; Robert, 1984).

Las técnicas de cultivo de tejidos también pueden ser utilizadas para obtener híbridos entre especies incompatibles a través de las técnicas de cultivo de embriones, cultivo de óvulo, o la hibridización somática (Torres, 1988). De manera que el cultivo aséptico se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el "rescate" de los embriones que no crecen ni se convierten en plántulas. En un sentido estricto, el material no se multiplica clonalmente, pero si se está multiplicando el germoplasma que de otra forma se perdería.

Existen diversos métodos ó procedimientos que se pueden utilizar para la multiplicación masiva de especies de interés; a partir de inóculos de brotes apicales o yemas axilares, por la formación de brotes adventicios o por embriogénesis somática a partir de callo o callo semiorganizado obtenido

a partir de diversos tipos de inóculos (Krikorian; Sagawa y Kunisaki, citados por Ambriz, 1995).

### **La función de los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.**

El descubrimiento de Skoog y Miller quienes señalaron que la iniciación de raíz y brote es básicamente regulada por la interacción entre dos sustancias hormonales (auxina y citocinina) constituye el principio por el cual ha sido posible la aplicación del cultivo de tejidos en numerosas especies (Murashige, 1974).

Una alta relación de citocinina:auxina estimula la formación de yemas cuando estos compuestos son adicionados al medio de cultivo; una alta concentración relativa de auxina favorece la iniciación de raíces, al mismo tiempo que reprime la formación de brote, por lo que el tipo de morfogénesis que ocurre en una planta a través del cultivo de tejidos depende considerablemente de la relación citocinina-auxina endógena presente en el medio (Murashige, y Torres citados por Ambriz, 1995).

### **Cultivo de tejidos en cítricos.**

La extensa aplicación práctica actual de las técnicas de cultivo de tejidos, ha involucrado ampliamente el aspecto de micropropagación de especies ornamentales, se han adaptado estas técnicas en ornamentales herbáceas con relativa facilidad pero sin embargo, se requieren más esfuerzos para aplicar con éxito las técnicas *in vitro* a especies leñosas.

La mayoría de las especies frutales han sido propagadas tradicionalmente utilizando técnicas vegetativas, pero el impacto potencial de la aplicación del cultivo de tejidos en frutales se refleja en la necesidad de propagación de cultivares y líneas de portainjertos élite, en la eliminación de virus y patógenos de los tejidos, en la conservación de germoplasma y en la producción de haploides para programas de mejoramiento principalmente (Torres, 1989).

Los cultivares de cítricos han sido propagados generalmente mediante el injerto de yemas de un cultivar sobre un portainjerto predeterminado. Este método de propagación presenta la desventaja de propagar enfermedades sistémicas causadas principalmente por virus y micoplasmas (Button, 1977).

Sin embargo, debido a que raramente las enfermedades causadas por virus son transmitidas por semilla, la obtención de plantas libres de virus ha sido estudiada en conseguir el brote nucelar de semillas poliembriónicas, aunque existen problemas cuando los clones de cítricos son monoembriónicos o bien no presentan semilla (Button y Kochba, 1977).

El cultivo de tejidos vegetales aplicado a cítricos ha sido estudiado por distintos investigadores, enfocados principalmente en la micropropagación, en la obtención de plantas libres de virus y en la espera de encontrar híbridos y algunas variaciones genéticas importantes.

El más notable éxito en el cultivo de células, tejidos y órganos de cítricos, para la obtención de plantas sanas, ha sido con variedades en las cuales naturalmente se presenta poliembriónia. Probablemente el más

grande obstáculo para desarrollar sistemas *in vitro* para la regeneración de cítricos es la ausencia de juvenilidad en árboles adultos (Bonga, 1982).

### **Micropropagación de cítricos.**

La propagación de portainjertos de cítrico son desarrollados comercialmente mediante la germinación de semillas producto de polinización abierta. Dependiendo del cultivar, pueden producir de 1% a 40% de plántulas de origen cigótico, manifestandose marcadas diferencias en su uniformidad clonal no deseables. También algunos cultivares producen poca o ninguna semilla, limitando su propagación. Mediante técnicas de cultivo de tejidos se ha obtenido homogeneidad y una media de número de brotes de 2, 3 y 7.3, utilizando como fuente de explante segmentos internodales de plántulas de naranjo agrio (*C. aurantium* L), Citrange carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y mandarina cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tanaka) respectivamente (Moore, 1986).

Con esos mismos cultivares, pero utilizando brotes apicales procedentes de plantas nucelares solo existió ploriferación de brotes en citrange carrizo con una media de brotación de 3.0 al utilizarse BA en concentración de 3 mg/l (Kitto y Young, 1981).

En la micropropagación de los portainjertos citremón 1452 (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. limon* (L.) Burm.), así como de la variedad *Flying dragon* de *Poncirus trifoliata* (L.); el primero con características favorables para el naranjo valencia (*C. sinensis* (L.) Osb.) y además ser resistente a la

*gomosis* y al *blight* y el segundo, por el especial interés de su marcada tendencia a producir árboles enanos, muy adecuados para plantaciones de alta densidad, se obtuvo una media de brotación de 3.2 y 6.7 respectivamente, cuando se utilizaron como explante segmentos nodales de plántulas de 10-12 cm. de altura (Mas *et al.* 1992; 1993).

### **Embriogénesis somática en cítricos.**

Es conocido que, con escasas excepciones de informes en los que se plantea la transmisión de *psorosis*, las virosis no se transmiten a las semillas de los frutos de un árbol enfermo, por lo que las plantas que se logran al sembrar dichas semillas estarán libres de enfermedades (Mas, 1995).

Por este motivo, es exitosa la utilización de la nucela como fuente de explante en la obtención de plantas sanas, vía la técnica de regeneración por embriogénesis directa, además se mantiene considerablemente el potencial morfogénético en muchas especies de plantas y por lo tanto la capacidad de producir embriones adventicios, sin embargo, el tejido regenerado presenta características de juvenilidad (Rangan *et al.*, 1968; 1969; Rangaswamy, 1982).

Para ayudar a una correcta selección de los brotes nucelares, se han desarrollado métodos bioquímicos y moleculares que permiten distinguirlos, de los de origen cigótico (Mas, 1995).

Con éste mismo propósito, la embriogénesis somática también ha sido

exitosa mediante el cultivo de óvulos fertilizados y sin fertilizar y protoplastos (Bitters, *et al.*, 1970; Deidda, 1973; Navarro y Juárez, 1977; Kobayashi *et al.*, 1982; Starrantino y Russo, 1980; Navarro, *et al.*, 1985; Jing-Tian, *et al.*, 1990; Tusa *et al.*, 1990). sin embargo, en todos los casos las plantas nucelares de cítrico presentan juvenilidad, por lo que éstas no pueden ser utilizadas en la propagación comercial a corto plazo, aunque son a futuro, una alternativa como fuente de material sano (Navarro *et al.*, 1979).

### **Justificación.**

La susceptibilidad al VTC y el interés por conservar la utilización del naranjo agrio (*C. aurantium* Linn.) como portainjerto de cultivares comerciales de cítrico, debido a sus buenas características agronómicas, nos lleva a la tarea de buscar con métodos biotecnológicos, una línea de este portainjerto con tolerancia al virus de la tristeza, mediante la recombinación genética del gene que codifica para la proteína de cubierta del VTC con el genoma de *C. aurantium*, para lo cual, se requiere de una técnica de cultivo de tejidos que nos conduzca a la regeneración *in vitro* apropiada del explante susceptible de ser transformado genéticamente.

## **HIPOTESIS.**

La aplicación exógena de un sistema balanceado de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, conducirá a la regeneración *in vitro* de Citrus aurantium Linn., cuando se utilice como inóculo, segmentos de hipocotilo de plántulas germinadas asépticamente.

## **OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo del presente estudio fué desarrollar un protocolo de cultivo de tejidos para la regeneración *in vitro* de Citrus aurantium Linn., que permita la utilización de técnicas de transferencia de genes.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- a) Determinar la combinación óptima de los reguladores de crecimiento (citocinina:auxina) para la proliferación de brotes adventicios de C. aurantium L. a partir de explantes de hipocotilo.
- b) Determinar la dosis óptima de reguladores de crecimiento (auxinas) que promueva la regeneración de raíces en los inóculos de C. aurantium L.

## MATERIALES Y METODOS.

### **Localización del experimento.**

El experimento se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, en Ciudad Victoria, Tamaulipas.

### **Material vegetativo.**

Semillas de Naranja agrio (*C. aurantium* Linn.) provenientes del banco de germoplasma "Francisco Villa" de Güémez Tamaulipas, fueron utilizadas en este experimento.

### **Germinación aséptica.**

Semillas de *C. aurantium* seleccionadas arbitrariamente por su mayor densidad fueron desprovistas del primer tegumento, después de ser tratadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos. Posteriormente se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% por 10 minutos. y posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos.

En campana de flujo laminar se enjuagaron abundantemente (3x) con agua destilada esterilizada antes de la siembra aséptica.

El medio de cultivo utilizado para la germinación consistió de las sales del M.S. (Murashige and Skoog., 1962), (apéndice) adicionado con 3% de sacarosa y las vitaminas del medio B5 de Gamborg (apéndice). El medio fue solidificado con agar al 0.75% y ajustado el pH a 5.7 antes de esterilizar en el autoclave a 15 lb. in<sup>-2</sup> por 20 minutos.

Para la germinación aséptica (Fig. A) se colocaron 2 semillas por tubo de cultivo de 18x150 conteniendo 15 ml. de medio basal M.S. sólido.

Se mantuvieron en cámara bioclimática a 30  $\pm$ 2 °C en completa oscuridad hasta que las plántulas tuvieron una altura de 5 cm.

### **Regeneración de brotes.**

Como medida preventiva para eliminar las posibles variaciones genéticas del tejido resultante del cultivo *in vitro*, se seleccionó la técnica de organogénesis directa para la regeneración de brotes.

Se realizaron ensayos previos para la selección de la fuente de explante debido a la diferencia en la respuesta del tejido de acuerdo a su posición en el hipocotilo (Fig. B).

Se disectaron los inóculos bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar y se colocaron en cajas magenta con medio MS suplementado con los tratamientos.

El experimento para la regeneración de brotes consistió de 36 tratamientos con 5 repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. Los reguladores de crecimiento estudiados fueron Benciladenina (BA) y Ácido indolbutírico (AIB). Los tratamientos estudiados (apéndice) fueron generados por la combinación de seis concentraciones de cada regulador de crecimiento. Las concentraciones utilizadas para Benciladenina y ácido indolbutírico fueron en  $\text{mg l}^{-1}$  0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 y 0,01, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 respectivamente.

El parámetro evaluado fue el número de brotes por explante que mostraron al menos 2 hojas desplegadas. Se excluyeron del análisis estadístico los tratamientos que mostraron tejido de callo, los cuales no son deseables en estudios de transferencia de genes.

Los cultivos se mantuvieron en cámara bioclimática a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  (Fig. C) con un fotoperíodo de luz fluorescente (3000 lux) de 16 h luz/oscuridad.

## **Regeneración de raíz**

Para los tratamientos de rizogénesis se consideraron dos fuentes de explante:

### **a) Hipocotilos etiolados**

Los explantes fueron segmentados después de completar las plántulas una altura de 5 cm y se colocaron en cajas magenta con los tratamientos.

en medio basal M S

b) Brotes regenerados del hipocotilo con al menos 2 hojas desplegadas

A los brotes se les disecto parte del tallo que estaba en contacto con el medio de cultivo o que presentaba formacion de callo y se colocaron en cajas de magenta con los tratamientos en medio basal M S

Los 2 experimentos para la regeneracion de raiz consistieron de 36 tratamientos combinados (apendice) y 3 repeticiones en un diseño experimental completamente al azar Los reguladores de crecimiento estudiados fueron acido naftalenacetico (ANA) y acido indolbutirico (AIB) las concentraciones estudiadas en  $\text{mg l}^{-1}$  fueron 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 para cada uno El medio basal fue adicionado de las vitaminas del medio B5 de Gambog 3% de sacarosa ajustado el pH a 5.7 y solidificado con agar al 0.75% Se esterilizo el medio a  $15 \text{ lb in}^{-2}$  por 20 min

Ambos experimentos se mantuvieron en camara bioclimatica a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo (3000 lux) de 16 h luz oscuridad proporcionado por lamparas fluorescentes de luz blanca por 2 meses

El parametro evaluado fue el enraizamiento *in vitro* considerando los tratamientos que presentaron formacion de raices secundarias

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### Regeneración de brotes.

Los inóculos se comportaron de la misma manera durante la primera semana de cultivo en los tratamientos. Después de 15 días, algunos explantes de *C. aurantium* L., observaron la presencia de primordios meristemáticos en la superficie del corte transversal (Fig. D). Las observaciones de las medias de brotación se evaluaron a los 30 días de cultivo, considerándose solo los brotes que mostraron al menos 2 hojas desplegadas.

Los resultados comparativos de los 36 tratamientos nos indican que existen varios tratamientos (cuadro E) que responden a la organogénesis directa y que no presentan formación de tejido de callo acompañando o cubriendo los brotes. El análisis de varianza de acuerdo al diseño utilizado, de los experimentos sin la presencia de tejido de callo, nos muestra significancia a un nivel del 95% de probabilidad, por lo tanto la hipótesis  $H_0$  se rechaza, concluyendo que al menos un tratamiento se comportó estadísticamente diferente.

Para determinar los mejores tratamientos se recurrió a la prueba de Tukey. Esta indicó que existen 5 grupos distintos estadísticamente y que el mejor tratamiento lo fué el nº. 17 (0.8 mg.l<sup>-1</sup> BA : 0.2 mg.l<sup>-1</sup> AIB) con una media de 8.0 brotes (apéndice).

Los tratamientos que indujeron la presencia de callo (Fig. E), fueron excluidos del análisis de datos (aunque algunos presentaban alto número de brotes), debido a la probabilidad de variación genotípica por la dediferenciación, por lo que no son recomendables estos tejidos para su utilización en estudios de transformación genética de acuerdo con Sorvari *et al.* (1993).

Los explantes que mostraron la presencia de brotes sin formación de callo después de 30 días de cultivo, fueron transferidos a medio MS al 50% para su elongación (fig. F). Los brotes desarrollados fueron morfológicamente normales.

### **Regeneración de raíz.**

Ambas fuentes de explante consideradas para la rizogénesis (Fig. G), fueron mantenidas en cámara bioclimática bajo un fotoperíodo de 16:8 h. luz:oscuridad de lámparas fluorescentes (3000 lux) a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Durante las 2 primeras semanas de cultivo, algunos explantes de brote sometidos a los tratamientos, presentaron formación de raíz.

Las observaciones se efectuaron a las 8 semanas y solo se consideraron aquellos tratamientos que mostraban la formación de raíz principal con raíces secundarias (Fig. H).

El resultado comparativo de los 36 tratamientos de rizogénesis, cuando

se utilizó como fuente de inóculo brotes regenerados del hipocotilo, nos muestra que existen 5 tratamientos que inducen la formación de raíz con raíces secundarias, utilizándose estos para el análisis estadístico. Debido a que ésta es una variable cualitativa dicotónica, que su distribución no es normal y al número de repeticiones, se analizaron los tratamientos utilizando la prueba de Q de Cochran. La comparación entre tratamientos con esta prueba, mostró diferencia significativa a  $p < 0.05$  con un valor calculado de  $Q = 6$ , por lo que la hipótesis nula se rechaza debido a que  $Q > 5.99$ .

En cuanto a los tallos etiolados, sometidos a los mismos tratamientos, no existió diferencia significativa ya que ninguno presentó formación de raíz (Fig. 1), aunque algunos presentaron formación de callo, callo con brote ó solo brote en la superficie del corte transversal.

Por lo anterior, los resultados de la regeneración *in vitro* de Citrus aurantium Linn. del presente trabajo, nos proporcionan ampliamente la posibilidad de utilizar los hipocotilos etiolados como fuente de inóculo para transformar genéticamente material de cítricos, principalmente por la gran reactividad del tejido para regenerar brotes adventicios múltiples en la superficie del corte transversal, lo que permite aumentar la probabilidad de regenerar brotes transformados, superando los resultados obtenidos por Kaneyoshi et. al. (1994) quien solo obtuvo una media de formación de brotes de 6.7 cuando utilizó como fuente de inóculo segmentos de epicotilo de Poncirus trifoliata Raf., en estudios de transformación genética.

El proceso de organogénesis directa sin desdiferenciación de tejido,

nos permiten suponer que la estabilidad genética del material regenerado se mantiene inalterada, cumpliendo así con los requisitos fundamentales marcados para protocolos de transformación genética de acuerdo con lo mencionado por Sorvari, *et al.* (1993), esto permite utilizar esta metodología en investigaciones subsecuentes en la búsqueda de material transformado de cítricos de importancia comercial.

Es significativo también, contar con un nivel hormonal para el enraizamiento *in vitro* de explantes de cítrico, debido a la dificultad reportada por Murashige (1974) para el enraizamiento de frutales y forestales, así como Barlass y Skene (1982), mencionan, que muy bajos porcentajes de enraizamiento eran logrados en cítrico, requiriéndose de altos niveles exógenos de auxinas. Es también importante notar que existió diferencia entre las fuentes de explante para la rizogénesis, ya que mientras la utilización de brotes regenerados la facilita; con tejidos etiolados, se ve inhibida, esto debido aparentemente por la acción endógena de auxinas del tejido ya formado. Se confirma también que las dosis mas altas de auxinas influyen en el enraizamiento

El enraizamiento logrado en este experimento, permite la regeneración completa de explantes de cítrico provenientes del hipocotilo de plántulas de *C. aurantium* L., con lo cuál se tiene la oportunidad de realizar futuras investigaciones en la búsqueda de variabilidad genética en cítricos, en especial, la resistencia a plagas y enfermedades, además, estos resultados permitirán la investigación de cítricos en otras áreas del conocimiento como la Fisiología, Bioquímica, Nutrición, etc., facilitándose el manejo del material

vegetativo bajo condiciones controladas en laboratorio.

### **Perspectivas de fitomejoramiento *in vitro* de cítricos.**

En corto plazo, la utilización de técnicas de transformación (tecnología ya validada con biolística), con el plásmido de *Bacillus thuringiensis*, que codifica para la delta endo-toxina de actividad insecticida para el control de lepidópteros, podrá proporcionar a variedades de cítrico tolerar el ataque de la larva del minador de la hoja, disminuyendo con ello la aplicación extensiva de pesticidas en futuras plantaciones, permitiendo esto disminuir gastos de producción, no dañar insectos benéficos y mantener un mejor equilibrio ecológico.

La utilización en un mediano plazo del gene de la capa protéica del virus de la tristeza de los cítricos en estudios de transformación, representará una alternativa para seguir utilizando el mejor portainjerto (*C. aurantium* L.), el cuál pese a sus ventajas agronómicas, es ampliamente susceptible a la infección VTC, razón por la cual ha sido prohibida su utilización en nuestro país por la dirección de Sanidad Vegetal de la S.A.R.H. (NOM. 001-S.A.R.H I-93) publicada en el diario oficial del 2 de junio de 1993.

## CONCLUSIONES

1.- La aplicación balanceada de reguladores de crecimiento BA-AIB da como resultado la regeneración *in vitro* de brotes adventicios múltiples de Citrus aurantium Linn. en la superficie del corte transversal de los inóculos utilizados.

2.- La aplicación balanceada de las auxinas ANA-AIB da como resultado el enraizamiento *in vitro* de C. aurantium L., cuando es utilizado como fuente de inóculo brotes de 2 meses de cultivo.

3.- El enraizamiento *in vitro* de C. aurantium L., está influenciado por la fuente de inóculo ya que cuando se utilizó como fuente los hipocotilos etiolados, éstos no respondieron a los propósitos del tratamiento.

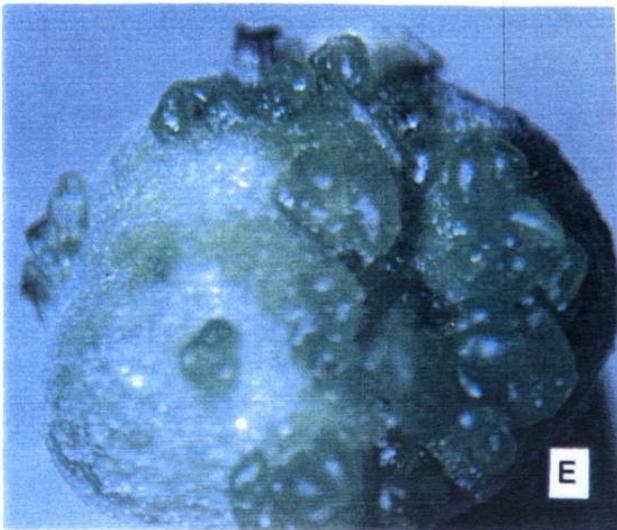
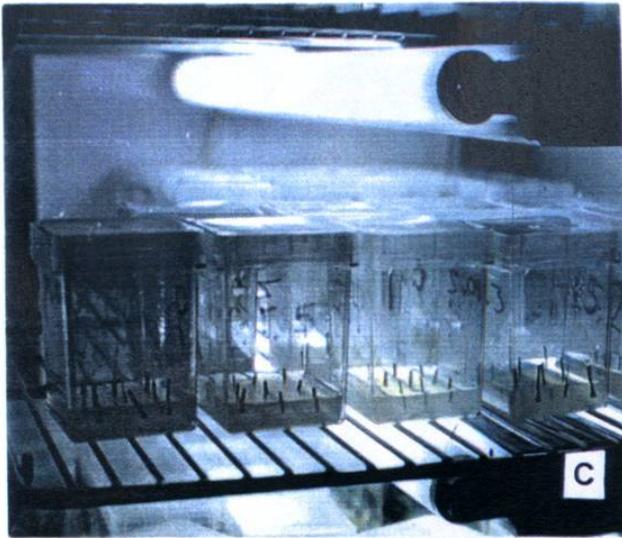
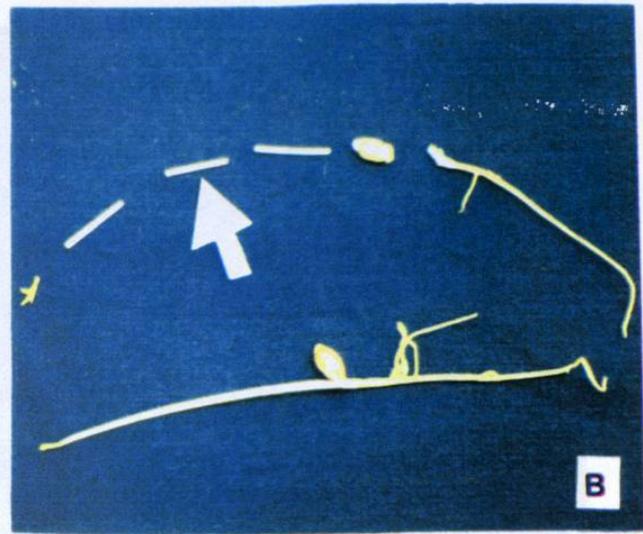
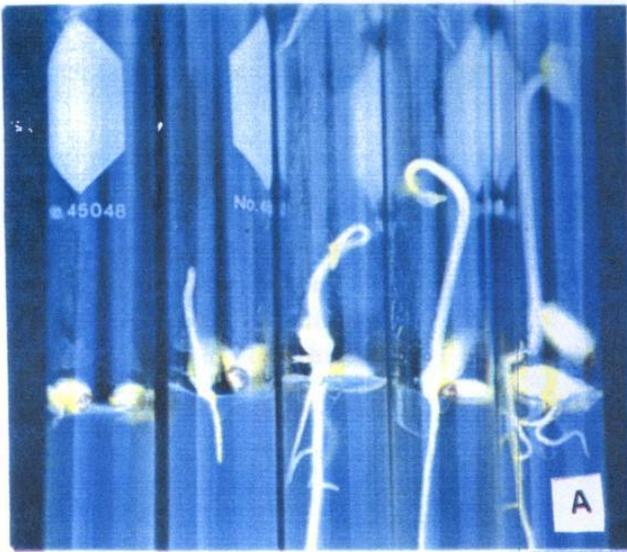


Fig. A. Germinación aséptica de *C. aurantium* L. B). Selección de la fuente de inóculo. C). Cultivo en cámara bioclimática. D). Primordios meristemáticos después de 15 días de cultivo. E). Múltiples primordios con presencia de tejido de callo. F). Elongación de brotes en medio basal M.S. al 50%.

Fig. G). Brotes de 2 meses de cultivo e hipocotilos etiolados como fuente de inóculo para la rizogénesis.

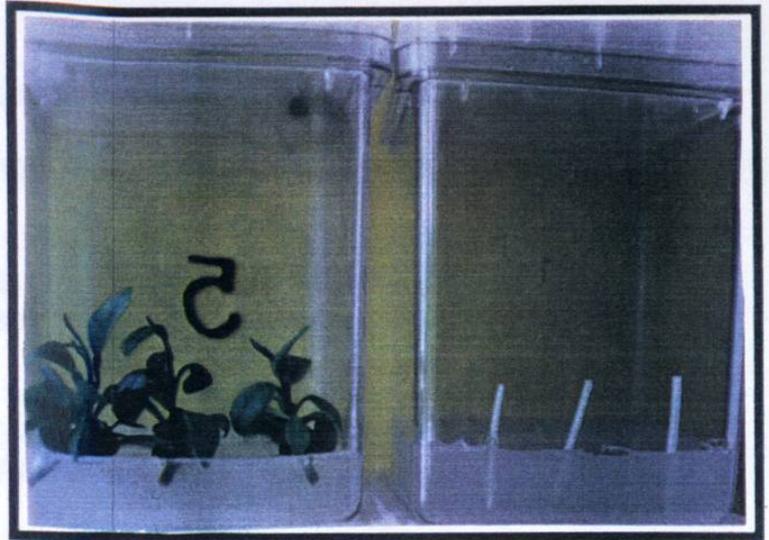


Fig. H). Formación de raíz a 8 semanas de cultivo, de explantes provenientes de brotes de 2 meses de cultivo.

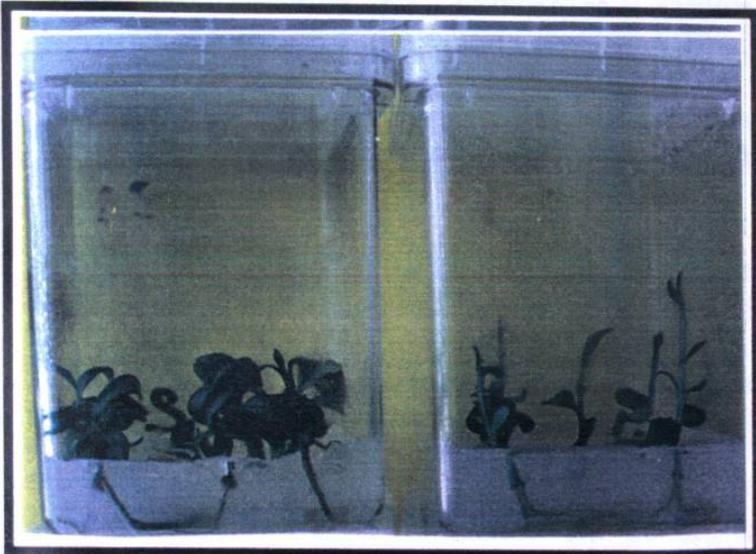


Fig. I). Explantes provenientes de hipocotilos etiolados no mostraron formación de raíz después de 8 semanas de cultivo.



## BIBLIOGRAFIA

- Agustí y Almela (1991). "Aplicación de fitoreguladores en citricultura" Ed. Aedos. Barcelona, España.
- Ambriz, G. (1995). "Micropropagación de brotes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Tesis de Maestría. Agronomía, U.A.N.L. Marín, Nuevo León.
- Balaraman K. (1987). "Cross protection performance trials on acid lime against tristeza virus in Southern India". *Mysore Journal of Agricultural Sciences*. 21:2, 193-195.
- Bar-Joseph, (1989). "Citrus Tristeza Virus Control". *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:291-316.
- Basurto, R.; Cásares, B.X.; Alvarez, M.A. (1990). "Programación genética de plantas e insecticidas" *Información Científica y Tecnológica*. CONACyT. pp. 66-72. México.
- Batista, *et al.* (1996). "Principales enfermedades virales, bacterianas y afines de los cítricos. Memorias del Curso Internacional de Citricultura. pp.149. Cd. Victoria, Tam. México.
- C.A.E.G.E.T., (1992). "Precauciones y usos de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza". *Pub. Esp. No. 2*. México. p.p. 21-30.
- Castle *et al.* (1986). "Rangpur lime for Troyer citrange, a hybrid citrus rootstock for closely spaced trees". *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 99, 33-35.
- Gómez, *et al.* (1996). "Problemática de los patrones cítricos". *Memorias del Curso Internacional de Citricultura*. pp. 20. Cd. Victoria, Tam. México.
- González G. R. Y M. Rocha P. (1984). "Detección del virus de la tristeza de los cítricos en México". *Proyecto cooperativo de investigación en virología vegetal*. INIA-UANL. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, General Terán.
- González, *et al.* (1984). "Guía para el cultivo de los cítricos en Nuevo León". SARH, INIA, CAEGE. General Terán, N.L. México, Folleto Técnico No. 1. 86p.
- González, N.; Peña, E.; Hernández, I. y Cáseres, I. (1995) "Comportamiento poblacional del minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Stainton en posturas de toronja *Citrus paradisi* Marsh". *Memorias del II taller nacional del minador de la hoja de los cítricos*. Instituto de Investigación de cítricos. Cd. Habana, Cuba.

- González G.R. y Vela M.M.C. (1984). "Detección del virus de la tristeza de los cítricos en los bancos de germoplasma de México". XI Cong. Nal. de Fitopatología. San Luis Potosí, México. Resumen ( No. 61 ).
- Gutiérrez, D.V. (1994). "La citicultura mexicana y sus perspectivas" Memorias del III Simposium Internacional sobre sistemas de producción de cítricos. Martínez de la Torre, Veracruz pp. 1-17.
- Klotz L.J. (1973). "Color handbook citrus diseases" University of California. Citrus Research Center. Riverside California. 122 p.
- Lastra R., Lee R., Rocha Peña, M. and Niblett C.L., Garnsey S.M. and Yokomi R.K. (1991). "Survey for presence of citrus tristeza virus and *Toxoptera citricidus* in México and Central América". CATIE-University of Florida-INIFAP/SARH-USDA. Turrialba, Costa Rica.
- Lee, R.F. and Rocha P. M. A. (1992). "Citrus tristeza virus" p.226-249 In: Plant diseases of international importance III. Mukhapaladhay, A. N., Chaube, H. S., Kumar, J. and Singh U. S. ( Eds. ). Prentice Hall. New Jersey.
- Li Xue-liu, *et al.* (1987). "Agricultural Entomology", Vol. 2. Shanghai. pp. 557. China.
- Ling, Jing-Tian; Nito, N.; Iwamasa, M. y Kunitake, H. (1990). "Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of satsuma". Hort Science 25 (8): 970-972.
- López, M.S., (1994). "Problemática de la citicultura en la zona norte del estado de Veracruz". Memorias del III Simposium Internacional sobre sistemas de producción de cítricos. pp. 50-63. Martínez de la Torre Veracruz.
- Martin, N. B., Sobrnhó, J. T., Assef, L. C. y Vega, A. A. (1985). "A importancia de pesquisa no desenvolvimento citricultura Paulista". Laranja. Rev. Tec. Cient. Citricultura, 6: 1-20.
- Mas, C. (1996). "Material de propagación de cítricos. -Sistema de producción de material de propagación certificado en Cuba". Memorias del Curso Internacional de Citricultura. pp. 15. Cd. Victoria, Tam. M'xico.
- Moreno P., Navarro L., Fuentes C., Piña J. A., Ballester, J. F. Hermoso de Mendoza A., Juárez, J. y Cambra, M. (1983). "La tristeza de los agríos". Problemática en España. I.N.I.A. Madrid, España. Hoja Técnica H.T. 47. p. 28
- Navarro, L.; Ortiz, J. M. y Juarez, J. (1985). "Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro" Hort Science 20 (2): 214-215.

- Palacios, J. (1978). "Citricultura Moderna". Ed. Hemisferio Sur. Argentina.
- Praloran, J.C. (1977). "Los agrios". Ed. Blume. Barcelona España.
- Pratt M. (1984). "Guía de Florida sobre insectos, enfermedades y trastornos de la nutrición en los frutos de los cítricos". Ed. Limusa. México. p.p. 83-86.
- Powell C. A., R. Pelosí R., Cohen M. (1992). "Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus". Plant disease, 76:2, 141-144.
- Racch B. and S. Singer. (1987). "Incidence and vector potential of the aphids which transmit citrus tristeza virus in Israel". Phytophylactica., 19:2, 173-177.
- Raimond, L. (1990). "Los agrios" Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Roistacher, C.N., Gumpf, D.J., Dodds, J.A., and Lee, R.F. (1991). "The threat of "the citrus killer". California. Citrograph. Vol. 76 10: 4,5,8,-12.
- Roistacher, C. N., and Moreno, P. (1991). "The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus". A review. p. 17-19 In:Proc. 11th. Conf. Int. Organ. Citrus Virologist. Riverside C.A.
- Roistacher C.N. y Bar Joseph M. (1987). "The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus - A review. pag. 7-9 in: Proc. 11 th Inter. Organ. Citrus Virol. Riverside California.
- Ruíz, C.E. y Coronado, B.J. (1994). "Minador de la hoja de los cítricos". Folleto Entomológico. CIDAFF-UAT Octubre de 1994. Cd. Victoria, Tam. México.
- Salibe A.A. (1988). "Incidencia de doencas viroticas en las regiones cítricas de América Central y el Caribe. Summa Phytopathologica, 14:42.
- Sannt, J. (1992). "Variedades de cítricos". Ed. Sinclair Int. Valencia, España
- Starrantino, A. y Russo, F. (1980). "Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars". Hort Science 15 (3):296-297.
- SDAFP. (1994). "Diagnostico sistema-producto de los cítricos en el estado de Tamaulipas" Gobierno del Edo. de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tam. México.
- Smith G.S., C. Farrald J. (1988). "Experimental transmission of exotic citrus tristeza virus by a Texas population of A. citricola from Marrs orange". Journal of the Rio Grande Valley Horticultural society, 41, 111-114.

- Sorvari, S.; Ulvinen, S.; Hietaranta, T. and Hiirsalmi, H. (1993). "Preculture medium promotes direct Shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks" Hort science 28(1) pp. 55-57.
- Tusa, N.; Grosser, J.W. and Gmitter, F.G. Jr. (1990). "Plant regeneration of valencia sweet orange, femminello lemon, and the interespecific somatic hybrid following protoplast fusion". Journal of the American Society for Horticultural Science. 115:6, 1043-1046.
- Vela, M. M. C. (1984). "Detección del virus la de tristeza de los cítricos en los bancos de germoplasma de cítricos de México mediante la técnica de inmunoadsorción ligada a enzima". Tesis de Licenciatura sin publicar. C. Biológicas U.A.N.L. Monterrey, N. L., México. p.p. 4-13.
- Yokomi, R. K., Garnsey, M., E. Civerola L., D. Gumpf J. (1987). "Transmission of exotic citrus tristeza virus isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*". Plant Disease,73:7,552-555.

## APENDICE

Compuesto	Concentración
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
KI	0.83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.30
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80

**Cuadro A).- Composición de las sales inorgánicas del medio básico Murashige-Skoog (1962) usado en  $\text{mg.l}^{-1}$ .**

Compuesto	Concentración
Acido nicotínico	0.1
Clorhidrato de tiamina	1.0
Clorhidrato de piridoxina	0.1
Glicina	0.2
Mio-inositol	10.0

**Cuadro B).- Composición del complejo B5 de Gamborg usado como complemento del medio MS.**

AIB	0.6	31	32	33	34	35	36
	0.4	25	26	27	28	29	30
	0.3	19	20	21	22	23	24
	0.2	13	14	15	16	17	18
	0.1	7	8	9	10	11	12
	0	1	2	3	4	5	6
		0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

BA

Cuadro C).- Combinación de tratamientos BA-AIB aplicados al medio básico M.S. para la regeneración de brotes adventicios de C. aurantium en mg.l<sup>-1</sup>

AIB	1	31	32	33	34	35	36
	0.8	25	26	27	28	29	30
	0.6	19	20	21	22	23	24
	0.4	13	14	15	16	17	18
	0.2	7	8	9	10	11	12
	0	1	2	3	4	5	6
		0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

ANA

Cuadro D).- Combinación de tratamientos de ANA-AIB aplicados al medio de cultivo M.S. para la regeneración de raíz en C. aurantium en mg.l<sup>-1</sup>.

TRATAMIENTO	CONC. BA:AIB (mg.l <sup>-1</sup> )	MEDIA DE N° BROTES
17	0.8 : 0.2 a	8.00
21	0.4 : 0.3 ab	6.66
12	1.0 : 0.1 ab	5.16
15	0.4 : 0.2 ab	5.00
22	0.6 : 0.3 ab	4.66
16	0.6 : 0.2 abc	4.33
18	1.0 : 0.2 bc	3.16
T	0.0 : 0.0 c	0.50

**Cuadro E).- El análisis de varianza de las medias de brotación entre tratamientos para la regeneración de brotes mostró diferencia significativa a  $p < 0.05$ . La prueba de Tukey indicó que al menos existen 5 grupos diferentes estadísticamente, siendo considerado el mejor el número 17.**

**Cuadro F).- Tolerancia a enfermedades de algunos patrones con naranja y toronja.**

PATRON	TRISTEZA	EXOCORTIS	PSOROSIS	XILOPOROSIS	GOMOSIS
TROYER	1	4	5	5	5
CARRIZO	1	4	5	5	5
SWINGLE	1	1	1	1	1
TRIFOLIATA	1	3	5	5	2
CLEOPATRA	2	1	1	1	5
RANGPUR	2	5	5	3	4
VOLKAMERIANA	2	2	1	6	5
RUGOSO	2	2	2	2	3
AGRIO	3	1	5	1	1

Fuente: CAEGET, 1992.

1.-Satisfactoria. 2.-Muy satisfactoria 3.-Muy insatisfactoria  
 4.-Insatisfactoria 5.-Aceptable 6.-Insuficiente información.

**Cuadro G).- Tolerancia a salinidad y tipo de suelo de algunos patrones con naranja y toronja.**

PATRON	CLORUROS	BORO	CALCIO	MAL DRENAJE	ARENOSO	LIMOSO	ARCILLOS.
TROYER	4	1	4	4	6	6	6
CARRIZO	4	1	4	4	6	6	6
SWINGLE	5	5	4	4	6	6	6
TRIFOLIAT.	3	1	3	2	6	6	6
CLEOPAT.	2	5	5	4	4	1	5
AMBLICAR.	1	6	5	6	6	6	6
VOLKAM.	6	6	1	4	6	6	6
RUGOSO	5	5	2	4	2	1	4
AGRIO	5	5	1	1	5	1	1

Fuente: CAEGET, 1992.

1.-Satisfactoria 2.-Muy satisfactoria 3.-Muy satisfactoria  
 4.-Insatisfactoria 5.-Aceptable 6.-Insuficiente información.

**Cuadro H).- Tolerancia a salinidad y tipo de suelo de algunos patrones con limas y limones.**

PATRON	CLORUROS	BORO	CALCIO	MAL DRENAJE	ARENOSO	LIMOSO	ARCILLOS
TROYER	4	4	4	4	4	1	1
CARRIZO	4	4	4	4	4	1	1
SWINGLE	6	5	1	4	5	1	5
TRIFOLIAT.	3	4	3	1	4	1	1
CLEOPAT.	2	5	5	4	4	1	5
VOLKAM.	6	6	6	4	6	6	6
RUGOSO	5	5	2	4	2	1	4
RANGPUR	2	1	5	4	1	1	5
AGRIO	6	5	1	5	5	1	1

Fuente: CAEGET, 1992.

1.- Satisfactoria 2.-Muy satisfactoria 3.-Muy insatisfactoria

4.-Insatisfactoria 5.-Aceptable 6.-Insuficiente

información.

**Cuadro I).- Efecto del patrón sobre el árbol de naranja y toronja.**

PATRON	FRUTO CALIDAD	TAMAÑO	VIGOR	TAMAÑO	RESISTENCIA A HELADAS
TROYER	5	5	1	1	1
CARRIZO	5	5	1	1	1
SWINGLE 4475	5	5	1	1	1
TRIFOLIATA	1	5	4	1	2
CLEOPATRA	1	4	5	1	5
AMBLICARPA	5	5	1	6	1
VOLKAMERIANA	3	6	2	2	4
RUGOSO	3	1	2	2	4
AGRIO	2	1	1	1	5

Fuente: CAEGET, 1992.

1.-Satisfactoria 2.-Muy satisfactoria 3.-Muy insatisfactoria

4.-Insatisfactoria 5.-Aceptable 6.-Insuficiente información.

**Cuadro J).- Efecto del patrón sobre el árbol de lima y limón.**

PATRON	FRUTO CALIDAD	TAMAÑO	VIGOR	TAMAÑO	RESISTENCIA A HELADAS
TROYER	5	5	5	5	5
CARRIZO	5	5	5	5	5
SWINGLE 4475	1	6	1	5	1
TRIFOLIATA	1	4	4	3	5
CLEOPATRA	6	5	5	5	6
RANGPUR	1	1	2	2	1
VOLKAMERIANA	3	6	2	2	6
RUGOSO	2	2	2	2	6
AGRIO	2	5	5	6	5

Fuente: CAEGET, 1992.

1.-Satisfactoria 2.-Muy satisfactoria 3.-Muy insatisfactoria  
4.-Insatisfactoria 5.-Aceptable 6.-Insuficiente información.

**Cuadro K).- Efecto del patrón en la producción de naranja valencia en General Terán.**

PATRON	ton./ha.*	kg/ha.*	alternancia en la producción**
CITRANGE SAVAGE	15.4	99.0	leve alternancia
CITRANGE CARRIZO	50.0	320.7	leve alternancia
MANDARINO CLEOPATRA	35.0	224.1	alternante
LIMON RUGOSO	37.1	237.1	leve alternancia
NARANJO AGRIO	41.7	267.1	leve alternancia

Fuente: CAEGET, 1992.

\*Producción promedio de 1977-1978 y de 1982-1983.

\*\*Según la variación del rendimiento: leve alternancia 30-40%  
alternante 50-70%

**Cuadro L).- Efecto del patrón en la calidad de la fruta en naranja valencia en General Tóran, N.L.**

PATRON	JUGO(%)	SOLIDOS(%)	KG SOLIDOS/TON. FRUTA	ACIDEZ (%)
CITRANGE SAVAGE	46.4	12.5	58.4	1.24
CITRANGE CARRIZO	49.0	11.8	57.6	1.31
MANDARINA CLEOPATRA	48.5	11.7	56.8	1.31
LIMON RUGOSO	47.2	11.5	54.5	1.30
NARANJO AGRIO	49.2	12.2	59.6	1.17

Fuente: CAEGET, 1992.

\*\*% con base en su peso.

