

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

Evaluación de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro* de *Citrus aurantium* (L.) “naranja agria” empleando el patrón “Citrumelo”

AUTOR:

CANALES CARRERA, Estefany Estrella

Para optar el Título de Bióloga con mención en Biotecnología

Asesor:

Dr. Noriega Córdova Huberto Williams


Prof. Dr. Huberto Noriega Córdova
E N U A

Huacho-Perú

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

Evaluación de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro* de *Citrus aurantium* (L.) “naranja agria” empleando el patrón “Citrumelo”

EVALUADO ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

Mg. Hermila Belba, Díaz Pillasca

Mo. Jorge Luis, Rojas Paz

PRESIDENTE

SECRETARIO

Lic. Gilberth, Pesantes Calderón

Dr. Noriega Córdova Huberto Williams

VOCAL

ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por el apoyo constante brindado, consejos y cariño.

A mi profesora y amiga, Carmen Rojas, por confiar siempre en mí y motivarme a crecer
profesionalmente.

AGRADECIMIENTO

Al CITE Agroindustrial Unidad Técnica Huaura, bajo la coordinación general del Lic. Juan Fumagalli Galli, por permitirme ejecutar la tesis de pregrado en el Laboratorio Agrícola, así como también al Ing. Brian Navarro Sandoval, por la supervisión, confianza y apoyo brindado.

Al Dr. Huberto Noriega Córdoba, porque a través de su experiencia y conocimientos permitieron concluir con el presente estudio.

Al Dr. Mauro Quiñones, por la aceptación y confianza brindada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Ricardo Palma, donde se dio inicio al presente trabajo.

A mis profesores de la Escuela de Biología con mención en Biotecnología, por sus enseñanzas y consejos para mi formación profesional.

A mi familia y amigos, por su guía, intercambio de conocimientos y escucha, durante las diferentes etapas de este estudio.

A mi compañero y apoyo, por su cariño, empatía y motivación en cada meta propuesta.

INDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCION	11
Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.1. Descripción de la Realidad Problemática.....	1
1.2. Formulación del problema.....	3
1.2.1. Problema general.	3
1.2.2. Problemas específicos.....	3
1.3. Objetivos de la Investigación.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Justificación de la Investigación.....	4
1.5. Delimitación del Estudio	5
Capítulo II: MARCO TEORICO	6
2.1. Antecedentes de la investigación.....	6
2.2. Investigaciones Internacionales.....	6
2.3. Investigaciones Nacionales.....	7
2.4. Bases Teóricas	8
2.5. Definición de términos básicos.....	10
2.6. Hipótesis de Investigación.....	14
2.6.1. Hipótesis General.....	14
2.6.2. Hipótesis Específicos.....	14
2.6.3. Operacionalización de Variables e Indicadores.....	15
Capítulo III: METODOLOGÍA	16
3.1. Diseño Metodológico.....	16
3.1.1. Tipo de Investigación.	16
3.1.2. Nivel de investigación.	16

3.1.3.	Diseño.....	16
3.1.4.	Enfoque.....	16
3.2.	Población y Muestra.....	17
3.2.1.	Población.....	17
3.2.2.	Muestra.....	17
3.3.	Técnicas de recolección de datos.....	17
3.3.1.	Técnicas a emplear.....	17
3.4.	Técnicas para el procesamiento de la información.....	23
Capítulo IV: RESULTADOS.....		24
4.1.	Prendimiento in vitro de microinjertos de C. aurantium sobre el patrón Citrumelo.....	24
4.1.1.	Influencia de la edad del patrón en el prendimiento in vitro.....	25
4.1.2.	Influencia de la concentración de sacarosa en el prendimiento in vitro.....	25
4.1.3.	Influencia de los métodos de colocación del ápice en el prendimiento in vitro.....	25
4.1.4.	Influencia de la interacción de dos parámetros de microinjertación en el prendimiento in vitro.....	25
4.1.5.	Influencia de la interacción de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento in vitro.....	26
Capítulo V: DISCUSIÓN.....		27
5.1.	Discusión de resultados.....	27
Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		30
6.1.	Conclusiones.....	30
6.2.	Recomendaciones.....	30
REFERENCIAS.....		32
7.1.	Fuentes Bibliográficas.....	32
7.2.	Fuentes Hemerográficas.....	37
7.3.	Fuentes Electrónicas.....	38
ANEXOS.....		40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de Variables e Indicadores	15
Tabla 2. Tratamientos empleados para el factor: edad del patrón.....	20
Tabla 3. Tratamientos empleados en el método de colocación del ápice.	21
Tabla 4. Tratamientos empleados para la concentración de sacarosa.....	22
Tabla 5. Diseño Factorial con tres factores	23

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> Frutos de Citrumelo, provenientes del fundo Sociedad Agrícola la Piramide- Huaral .	18
<i>Figura 2</i> A. Planta joven de <i>C. aurantium</i> . B. Segmentos internodales de <i>C. aurantium</i> en solución de detergente comercial.	19
<i>Figura 3</i> Germinación <i>in vitro</i> de semillas de Citrumelo.	19
<i>Figura 4</i> Introducción de segmentos internodales de <i>C. aurantium</i>	20
<i>Figura 5</i> Tipos de injerto <i>in vitro</i>	21
<i>Figura 6</i> Proceso de microinjertación <i>in vitro</i> . A. Brote de naranja agria. B. Ápice caulinar de naranja agria. C. Ápice caulinar, microinjertado en patrón Citrumelo, por técnica de T invertida	22
<i>Figura 7</i> Prendimiento <i>in vitro</i> de microinjertos de <i>C. aurantium</i> empleando el patrón Citrumelo. A., B. y C. Microinjertos prendidos. D. Brotes adventicios del patrón (hojas trifoliadas). E. Microinjerto por método de colocación sobre el anillo vascular. F. Microinjerto con T invertida.	24

RESUMEN

El cultivo de *Citrus aurantium* L., conocido comúnmente como naranja agria, es considerado de gran importancia en la provincia de Huaura, distrito de Huacho, debido al potencial gastronómico que demanda su empleo en las comidas típicas de la zona, sin embargo, los ejemplares de dicho cítrico, se encuentran de manera escasa, no solo por el descuido de los pobladores, sino también por su susceptibilidad a enfermedades como el CTV (virus de la tristeza de los cítricos). Existen estudios de micropropagación *in vitro* de dicho frutal pero no aseguran su conservación eliminando o disminuyendo su exposición a enfermedades. Es por ello que en la presente investigación, se plantea evaluar la influencia de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro* de “naranja agria” empleando el patrón “Citrumelo”, siendo una metodología que permite eliminar enfermedades, sobre todo virales en cítricos, por lo que es necesario generar bases para estudios posteriores, vinculados al saneamiento de dicho material vegetal. Los parámetros evaluados fueron la edad del patrón, el método de colocación del ápice y la concentración de sacarosa, determinándose un porcentaje de 13.3% de microinjertos prendidos y la influencia significativa de la concentración de sacarosa, mostrando diferencia significativa entre la mayor (70 g/l) y menor concentración (30g/l) empleada, así como la interacción entre la edad del patrón y el método de colocación del ápice.

Palabras clave:

Microinjertación, prendimiento *in vitro*, *Citrus aurantium*, Citrumelo, edad del patrón, método de colocación, sacarosa.

ABSTRACT

The cultivation of *Citrus aurantium* L., commonly known as sour orange, is considered of great importance in the province of Huaura, district of Huacho, due to the gastronomic potential that its use demands in the typical foods of the area, however, the specimens of said citrus, they are scarce, not only because of the discovery of the inhabitants, but also because of their susceptibility to diseases such as CTV (citrus tristeza virus). There are in vitro micropropagation studies of this fruit tree but they do not ensure its conservation by eliminating or reducing its exposure to diseases. That is why in the present investigation, it is proposed to evaluate the influence of three micrografting parameters in the in vitro setting of "sour orange" using the "Citrumelo" pattern, being a methodology that allows to eliminate diseases, especially viral in citrus, therefore, it is necessary to generate bases for subsequent studies, linked to the sanitation of said plant material. The parameters evaluated were the age of the rootstock, the method of placement of scion and the concentration of sucrose, determining a percentage of 13.3% of attached micrografts and the significant influence of the concentration of sucrose, showing a significant difference between the highest (70 g/l) and lower concentration (30g/l) used, as well as the interaction between the age of the rootstock and the method of placement of scion.

Keywords:

Micrografting, in vitro grafting, *Citrus aurantium*, Citrumelo, rootstock age, method of placement of scion, sucrose.

INTRODUCCION

Los frutos de *C. aurantium* L., “naranja agria”, son empleados en la elaboración de platos típicos de la provincia de Huaura, ciudad de Huacho, considerándose un ingrediente tradicional para la zona, y que además es reconocido en la gastronomía como un ingrediente importante sensorialmente (Román, 2006; IICA, 2014). Además, en otros países que poseen dicho cultivo, es empleado por sus características medicinales (Lv et al. 2015; Segun et al. 2018) y por ser un portainjerto para diferentes variedades de importancia comercial y otros usos como la extracción de aceites esenciales (Rivera-Cruz, Trujillo-Narcía, & Alejo, 2010), sin embargo, la susceptibilidad a enfermedades como el CTV (virus de la tristeza de los cítricos), ha generado el descenso de su propagación (Madariaga, 2017) y por tanto la insuficiencia de sus ejemplares.

Ante ello, el empleo de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético vegetal, como el uso de microinjertos *in vitro*, se presenta como una alternativa para la conservación de un material vegetal tan importante y para el saneamiento de enfermedades, por lo que en el presente estudio, se plantea la evaluación de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro* de naranja agria, empleando el patrón Citrumelo, ya que para la obtención de plantas sanas, inicialmente se deben realizar ensayos de microinjertación, evaluando diferentes factores influyentes en dicho proceso, y establecer una metodología que permita un mayor porcentaje de prendimientos *in vitro*, lo que promueva continuar con las diferentes etapas que abarcan dicho proceso a corto plazo.

Es así que la presente investigación plantea determinar la influencia de tres parámetros: edad del patrón, concentración de sacarosa y método de colocación del ápice, de manera individual y conjunta, a través de interacciones, empleando un diseño trifactorial, teniendo como variable respuesta, el porcentaje de prendimiento.

Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.Descripción de la Realidad Problemática

Los problemas fitosanitarios extendidos en campos de cultivos de las regiones costa y selva del Perú, son la causa principal de la disminución de la población de cítricos (Sánchez, 2012).

Al norte de nuestro país, en el kilómetro 148 de la Panamericana Norte (ciudad de Huacho), *Citrus aurantium* (naranja agria), posee frutos empleados en la elaboración de sus principales comidas típicas como el ceviche de pato, la salchicha huachana e inclusive en bebidas como el pisco sour (Román, 2006), siendo considerado un ingrediente tradicional de la zona; además de ser reconocida en la feria gastronómica “Mistura 2011” por ser empleado en la preparación del “mejor ceviche peruano” (IICA 2014), existiendo libros que datan del siglo XIX, en los que se utilizaba como insumo en el ceviche de pescado, sudado y causa limeña (Coloma, 2010; Reyes, 2016; Zapata, 2013).

En otros países, donde se encuentra distribuido este cultivo, la importancia radica en sus usos medicinales, debido al contenido de flavonoides que regulan la respuesta inflamatoria, las enfermedades cardiovasculares y la carcinogénesis (Lv et al. 2015; Segun et al. 2018), otro notable uso es como portainjerto de diversos cítricos de importancia económica como el limón persa y naranja dulce, así como también la obtención del aceite de nerolí, proveniente de sus hojas (Rivera-Cruz, Trujillo-Narcía, & Alejo, 2010).

La baja producción de *C. aurantium*, pone en evidencia su escasez; al ser sustituida por otros cítricos de mayor productividad, estacionalidad y calidad, como también el abandono de huertos que antes lo cultivaban (IICA 2014); siendo la infesta por áfidos, causante principal en la disminución de rendimientos y calidad de las semillas, evitando el desarrollo normal del cultivo (Delfino y Buffa, 2008); puede transmitir diversas enfermedades como por ejemplo el virus de la

tristeza de los cítricos (CTV), produciendo marchitez, defoliación, detención del desarrollo, e incluso su muerte (Madariaga, 2017). Así mismo, es poco frecuente encontrar plántulas jóvenes de *C. aurantium*, observándose plantas añejas de aproximadamente 50 años, u otras utilizadas como portainjerto, que no necesariamente, se encuentran libre de enfermedades.

Una solución reportada por algunos autores como Tallón, Porras, & Pérez-Tornero (2012) en España, es la propagación vegetal *in vitro*, evaluando desde el establecimiento *in vitro* de *C. aurantium* y *Citrus reshni* (mandarina cleopatra), hasta el proceso de aclimatación, para su posterior empleo en mutagénesis o transformación genética de las mismas.

Además, se conoce sobre estudios realizados por Navarro, Roistacher & Murashigue (1975) quienes emplean microinjertos *in vitro* para el desarrollo de cítricos libres de virus, evaluando las condiciones adecuadas tanto para el patrón citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* (L.) Raft. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y limonero rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) como el microinjerto a desarrollarse, manifestando ser la técnica más recomendada para la propagación de dichos frutales.

Vega (1997), recomienda realizar estudios en condiciones locales, siendo la propagación *in vitro* variable de acuerdo al tipo de explante que se utilice, la edad de la planta, las condiciones ambientales en las que se encuentre y las características genotípicas que presente la especie (Tallón, Porras, & Pérez-Tornero, 2012).

Siendo la naranja agria un cultivo de importancia por sus características organolépticas, medicinales, entre otros; en vista de su afección fitosanitaria y dado que no se cuenta con protocolos establecidos que permitan obtener de manera masiva y en menor tiempo dicho material vegetal en nuestro país, es que se ve por conveniente realizar un cultivo *in vitro* por medio de microinjerto, centrado en la evaluación de tres parámetros de microinjertación en el

proceso de prendimiento *in vitro* de *C. aurantium* empleando el patrón trifoliado *Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macfad “Citrumelo”.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general.

- ¿Cuál será la influencia de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro* de *Citrus aurantium* “naranja agria”, empleando el patrón “Citrumelo”?

1.2.2. Problemas específicos.

- ¿Cuál será la influencia de la edad del patrón Citrumelo en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria?
- ¿Cuál será la influencia de la concentración de sacarosa empleada en el medio de cultivo, en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo?
- ¿Cuál será la influencia de los métodos de colocación del ápice de naranja agria, en el prendimiento *in vitro* de microinjertos sobre el patrón Citrumelo?
- ¿Cuál será la influencia de la interacción de dos o tres parámetros en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo?

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo general.

- Evaluar la influencia de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro* de *Citrus aurantium* “naranja agria”, empleando el patrón “Citrumelo”.

1.3.2. Objetivos específicos.

- Determinar la influencia de la edad del patrón en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria.

- Establecer la influencia de la concentración de sacarosa en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo.
- Determinar la influencia de los métodos de colocación del ápice de naranja agria en el prendimiento *in vitro* de microinjertos, sobre el patrón Citrumelo.
- Analizar la influencia de la interacción de dos o tres parámetros en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo.

1.4. Justificación de la Investigación

Se estima entre el 20% y 40% de pérdidas de productividad por año a causa de los problemas fitosanitarios en nuestra agricultura, considerándose en la citricultura que el 50% logra destinarse al mercado exterior y el 50% restante al mercado interno, por presentar los problemas antes mencionados (Vázquez & Ortiz, 2019); por ello a través del Instituto de Innovación Agraria (INIA) se ha puesto en marcha recientemente el empleo de la técnica de microinjertos de ápices caulinares, para salvaguardar los cultivos de cítricos del país (MINAGRI 2018). Sin embargo, *C. aurantium*, no es un cítrico de exportación y presenta reducida demanda a nivel nacional (Paino and Donovan 2012), por ello en la presente investigación se opta por el empleo de dicha técnica, innovadora para nuestro país aunque con bases preexistentes a nivel mundial, siendo la más recomendada para el saneamiento *in vitro* de plantas infectadas por enfermedades (Cortés, 2004), con el fin de lograr posteriormente el establecimiento de un protocolo de microinjertación de esta especie vegetal promoviendo su conservación con un control eficiente de un cultivo de importancia gastronómica para la zona, brindando a nuestra localidad mayor demanda turística, por consiguiente mayores ingresos económicos y oportunidades a futuro. Asimismo se abrirán brechas para futuras investigaciones, teniendo en cuenta que es un proyecto de mayor amplitud,

lo que sentará bases para el mejoramiento genético, bancos de germoplasma, u otros estudios orientados a los diferentes beneficios de este cítrico.

1.5. Delimitación del Estudio

El estudio se realizó en las instalaciones del CITE Agroindustrial U.T. Huaura, ubicado en el distrito de Santa María, Provincia de Huaura transportándose 12 plantas jóvenes de *C. aurantium* provenientes del vivero frutícola “San José” ubicado en la ciudad de Huacho, Provincia de Huaura, Departamento de Lima, así como también frutos de Citrumelo provenientes de Sociedad Agrícola La Piramide S.A.C.-Huaral.

Capítulo II: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Las investigaciones relacionadas al cultivo *in vitro* de *C. aurantium* L., están relacionadas a la micropropagación clonal del cultivo en sus diferentes etapas, ya sea a partir de brotes como lo reportado por Hernández-Amasifuen, Pineda-Lázaro & Díaz-Pillasca (2021) que determinaron la mayor inducción de brotes empleando 0.25 mg/l de cada uno de los reguladores (BAP, KIN y AG₃) y el mayor porcentaje de enraizamiento con 1mg/l de BAP y ANA; o también la propagación *in vitro* por semillas descrito por Rosabal Pérez et al. (2021), cuya concentración de 1mg/l de BAP, les permitió obtener el mayor número de brotes en el primer subcultivo.

Por otro lado la susceptibilidad al CTV (virus de la tristeza de los cítricos) que presenta *C. aurantium* L. al ser empleado como patrón, ha reducido su propagación (Martínez-Hernández et al. 2006), y los estudios de microinjertos empleando ápices meristematicos de naranja agria, aún no se han presentado, por lo que se consideraron como referencias, estudios de microinjertos en otras especies de cítricos.

2.2. Investigaciones Internacionales.

Naz, Jaskani, Abbas, Qasim, & Khan (2007), evaluaron tres concentraciones de sacarosa (3,5 y 7%) combinados con dos métodos de colocación (T invertida y colocación en superficie) en mandarina Kinnow y naranja dulce Succari sobre limón rugoso, determinando que el 5% y 7% de concentración de sacarosa, permitían un mayor porcentaje de prendimiento en ambos cultivares; mientras que ambos métodos de colocación influyeron significativamente en dicha unión, diferenciándose en la aparición de brotes adventicios, siendo menor con el empleo de T invertida.

Asimismo, Singh, Meetei, Kundu, Salma, & Mandal (2018), reportan respecto a las edades de los patrones empleados para injertar mandarina Khasi, que el mayor porcentaje de prendimiento (58.5%) se obtuvo con limón rugoso Nemutenga a los 13 días de edad, mientras que con los patrones cidra Tayum de 15 días y naranja dulce Tasi de 17 días, el 48.9% y 34.5% respectivamente; también mencionan en cuanto al método de colocación del ápice mayor éxito empleando el injerto por hendidura (56.4%) a comparación de T invertida (47.5%). Con relación a la concentración de sacarosa evaluado luego de una siembra inicial que contenía reguladores de crecimiento (BAP e IAA), se obtuvo un mayor porcentaje de microinjertos prendidos (56.8%) añadiendo 5% de sacarosa. No obstante Vanegas, Zamora, & Vargas (2004), en su trabajo relacionado a la microinjertación en cítricos a escala comercial, logró el mayor porcentaje de prendimiento con 7.5% de concentración de sacarosa.

Le, Sakai, Mizunoe, Ozaki, & Wakana (2020), evaluaron portainjertos de cítricos con diferentes edades que variaron entre 2, 4, 8 semanas hasta 4 y 8 meses después de su germinación, respecto a la ubicación de la decapitación (superior, medio e inferior) para la formación de brotes adventicios y axilares, concluyendo que las de menor edad (2 semanas) eran las más eficientes posibilitando el crecimiento inicial de brotes adventicios y brotes axilares, además la decapitación en el tercio superior y medio de los epicótilos fue mayor que el tercio inferior.

2.3. Investigaciones Nacionales.

Lihua (2018), evaluó el efecto de la sacarosa y cotiledones sobre el prendimiento de microinjertos *in vitro* de Naranja y limón (*Citrus sp.*), empleando el portainjerto Citrange Troyer. Con respecto a la adición de sacarosa, la concentración de 45 g/l, influyó en el prendimiento de limón Eureka, mientras que en naranja Washington Navel, el mayor porcentaje de

prendimiento se logró sin cotiledones, indistintamente de la concentración de sacarosa en el medio. En cuanto al número de hojas desarrolladas de limón, la concentración de 45g/l de sacarosa influyó positivamente, mientras que en naranja la concentración de sacarosa y el número de cotiledones no mostraron influencia alguna. Finalmente el tamaño de hojas tampoco fue dependiente de ninguno de los factores mencionados.

Tirabante (2018), evaluó la influencia de la microinjertación en el saneamiento del CTV, en variedades como tangelo y limón, utilizando dos primordios foliares en el injerto y 30 y 75 g/l de sacarosa, no encontrando diferencias significativas entre ambos. Además la presencia de cotiledones tampoco mostró diferencias significativas, pero el patrón que conservaba los cotiledones, mostró yemas vigorosas y la disminución en el crecimiento del ápice injertado.

2.4. Bases Teóricas

El presente proyecto fundamenta su desarrollo investigativo en las bases teóricas de Murashige, et al. (1972), quien refiere que el uso de ápices caulinares *in vitro* impide el ingreso de patógenos en el interior de la planta, lo que hace a la técnica del microinjerto superior a otros, en cuanto a la obtención de plantas libres de virus u otras enfermedades, además menciona que las plantas obtenidas, no presentan caracteres juveniles. Dicha técnica ejecutada y mejorada por Navarro et al. , (1975), se encuentra vigente, por lo que sirve de soporte para el presente trabajo.

En los cítricos, los métodos de multiplicación aséptica presentan numerosas ventajas, con respecto a los métodos tradicionales de propagación (semillas e injertos), debido, a que permiten obtener elevadas tasas de multiplicación en corto tiempo, empleando espacios reducidos y sin las limitaciones impuestas por la época del año. Además de que posibilitan la eliminación de patógenos no obligados y promueven la liberación de patógenos sistémicos (Iglesias, Rojas, &

Enríquez, 2001), mantienen la uniformidad genética y preservan rasgos específicos, los cuáles influirán en el futuro crecimiento de la variedad injertada (Tallón, 2015; Chagolla, 1990), también nos brinda la oportunidad de producir especies que requieren ser conservadas a gran escala, evitando así, la pérdida parcial o total de ese recurso valiéndose de los reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas), añadidas al medio de acuerdo a los requerimientos de la planta (Cueva, 2015). La técnica de propagación *in vitro*, en cítricos, se realiza comúnmente a través de microinjertos, siendo esta técnica adecuada para la obtención de plantas libres de virus, de rápida fructificación y sobre todo con ausencia de variaciones genéticas (Hernández, 1996).

La técnica estándar descrita por Navarro et al. (1975) se usa en laboratorios relacionados a la mejora sanitaria de cítricos, e incluye las etapas de preparación del patrón, preparación del ápice (injerto), cultivo *in vitro* de plantas injertadas y trasplante a macetas en invernadero.

Se tiene que las especies de *C. aurantium* pertenecientes a la división Espermatofitas, subdivisión Angiosperma, clase Dicotiledóneas, subclase Archiclamídeas, orden Geraniales, de suborden Geraninas, familia Rutáceas, subfamilia Aurantioideas, tribu Cítreas, subtribu Citrinas, género Citrus (Agustí & Almela, 1991), conocida comúnmente como naranjo amargo o naranja agria, con frutos de tamaño medio y forma esférica, globosos, de color naranja intenso en la madurez, pulpa jugosa, de color naranja pálido, ácido y con un característico sabor amargo (Ancillo & Medina, 2014), es utilizado en la ciudad de Huacho para la preparación de comidas típicas como ceviche de pato y salchicha huachana (Román, 2006), sin embargo los productores, en su mayoría, no conducen sus plantaciones con adecuado manejo agronómico, mostrando deficientes prácticas de fertilización, riego, control de plagas y enfermedades (Vegas & Narrea,

2011), generando una baja rentabilidad del cultivo y disminución notoria de estos frutales (Municipalidad Provincial de Huaura, 2013).

Por ello, si bien es cierto, la técnica de microinjertación permite la obtención de plantas asépticas, inicialmente en la introducción del material vegetal *in vitro*, es necesaria la eliminación de microorganismos (bacterias y hongos) que desde su colección, conviven con ellas; para ello se realiza una evaluación de desinfectantes en cuanto a su tiempo de exposición y la concentración más adecuada que permita su regeneración en los medios de cultivo, logrando así su establecimiento (Perla, 2007).

El balance de los reguladores del crecimiento también es evaluado en diferentes las etapas del ciclo de micropropagación. Durante la fase de multiplicación resulta esencial la adición de citoquininas, siendo BA la más usada en estudios de proliferación en cítricos (Tallón, 2015). Sin embargo, la influencia de estos reguladores en el proceso de microinjertación, depende de las especies a emplear, donde su concentración y efectos varían según la asimilación del explante y tipo, entre otras variables.

Otros parámetros descritos por Navarro et al. (1975), que influyen en el microinjerto de ápices caulinares son la edad del patrón, el método de colocación del ápice o vástago (T invertida, sobre anillo vascular, etc.), la concentración de sacarosa, que puede incrementar el número y tamaño de hojas, e inclusive el patrón a emplearse, lo que permitirá el prendimiento y la eliminación de virus y virosis; por otro lado se recomienda el uso de patrones trifoliados ya que favorecen la eliminación de crecimientos adventicios (Cortés, 2004).

2.5. Definición de términos básicos

2.5.1. Ápice Caulinar.

Conocido como brote apical, conformado por un meristemo apical, primordios foliares y el tejido contiguo al tallo (Zaid et al. 2004).

2.5.2. Microinjerto.

Técnica basada en la obtención, en condiciones asépticas *in vitro*, de plantas libres de patógenos, mediante el desarrollo de un meristemo apical o ápice caulinar colocado sobre el epicótilo decapitado de una planta originada a partir de semilla denominado patrón (Gravina & Piestun, 1991). Dicha técnica, presenta los siguientes pasos:

2.5.2.1. Preparación del patrón.

Los patrones conocidos como portainjertos formarán el sistema radicular de la especie seleccionada, encargándose de la absorción de nutrientes, favoreciendo el crecimiento y confiriendo tolerancia a algunas enfermedades (Anderson et al. 1996). Se obtienen por medio de la germinación de semillas *in vitro*, se elimina el tegumento, se esterilizan en superficie y se siembran en tubos de ensayo con medio de cultivo. Los cultivos se incuban en oscuridad a 27°C comúnmente. Los patrones a utilizarse deben tener dos semanas de edad aproximadamente, se sacan del tubo de ensayo y se decapita aproximadamente 1.5cm del tallo. Se corta el extremo de la raíz, dejando 4-5 cm de la misma y se eliminan los cotiledones (Navarro & Juarez, 2005).

2.5.2.2. Preparación del ápice.

Los ápices caulinares pueden aislarse de brotes vegetativos en crecimiento activo de plantas cultivadas en campo o invernadero o de varetas cultivadas *in vitro* (Navarro & Juarez, 2005). Los virus no llegan a alcanzar el meristemo, por lo tanto, los meristemas con 2 a 4 primordios foliares y una longitud de 0,12 a 0,18 mm se consideran óptimos para lograr un buen equilibrio entre el porcentaje de microinjertos prendidos y la eliminación de virus (Gravina & Piestun, 1991).

2.5.2.3. Cultivo de microinjerto.

Los primordios foliares de mayor tamaño del brote se eliminan con ayuda de un microscopio y con instrumentos de microdissección, aislándose el ápice caulinar compuesto por meristemo apical y 2-3 primordios foliares con un tamaño entre 0.1 y 0.2 mm. El ápice se coloca en el interior de la incisión del patrón con la superficie de corte en contacto con el corte expuesto por el corte horizontal de incisión, proceso llamado método de colocación del ápice; existiendo diversos métodos de colocación, T invertida, es el más recomendado (Navarro & Juarez, 2005).

En cuanto al medio de cultivo, uno de los factores más influyentes según Navarro et al. (1975), es la concentración de sacarosa, que permite un mayor porcentaje de prendimiento con 7,5%, así como el aumento de número de hojas frente a concentraciones inferiores.

2.5.2.4. Transplante a suelo.

Las plantas con al menos dos hojas expandidas, entre 3 a 5 semanas después de ser injertadas, se trasplantan a macetas, con suelo apto para cítricos. Inicialmente se colocan bolsas plásticas, luego se abren y finalmente se las retira, conforme transcurren las semanas (Navarro & Juarez, 2005).

2.5.2.5. Indexing de plantas.

Viene a ser la determinación de la presencia de patógenos, mediante la observación de síntomas de los diferentes patógenos, infectados con una planta enferma, o que ya se encontraban infectando a la planta utilizada como ápice. Se emplean pruebas de ELISA, PCR, entre otros.

2.5.3. Reguladores de crecimiento.

Son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen en el crecimiento y el desarrollo, se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades.

Actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Zegarra, 2014).

2.5.3.1. Citoquininas.

Son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, las más comunes y sintéticas son la KIN (Kinetina: 6-furfunil aminopurina) y BAP (N-6- bencilaminopurina o N6-benciladenina), siendo esta última la más eficaz y comúnmente utilizada en la regeneración de patrones de cítricos (Bordón, Guardiola, & García-Luis, 2000).

Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas (1^{-10} uM/l) pueden inducir la formación de vástagos adventicios e inhibir la formación de raíces. También promueven la formación de vástagos axilares, disminuyendo la dominancia apical, y retardando el envejecimiento (Pierik, 1999). El nivel de citoquinina usada en el medio es crítico para la regeneración de yemas (Moreira-Dias, Molina, Bordón, Guardiola, & Garcia-Luis, 2000), debido a que altas concentraciones pueden resultar tóxicas en la organogénesis de algunos genotipos (Almeida, Mourão-Filho, Mendes, & Rodriguez, 2002).

2.5.3.2. Giberelinas.

La giberelina más difundida es el GA₃ o ácido giberélico, actualmente se conocen más de 90 giberelinas diferentes, encontrándose en una misma planta solo algunas de ellas (Zegarra, 2014). Estas hormonas provocan el alargamiento celular, eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla mediante la inducción de la producción de la α -amilasa, inducen la floración de plantas, pueden también eliminar la dormancia de las yemas, inducir la elongación de los entrenudos, el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*. Generalmente se usa en

concentraciones que van de 0.01 a 1.00 mg/L., con un punto óptimo de alrededor de 0.10 mg/L (Roca & Mroginski, 1991).

2.5.3.3. Auxinas.

La auxina predominante es el ácido indolacético (IAA), encontrándose comúnmente en regiones de crecimiento activo como los meristemas apicales, permiten el crecimiento y formación de raíces, siendo la concentración óptima para promover elongación de tallos entre 10^{-6} y 10^{-5} M, pero a su vez esta concentración retarda el crecimiento de raíces. Así mismo permite la abscisión de órganos, diferenciación vascular, dominancia apical, entre otros (Jordán & Casereto, 2006).

2.6. Hipótesis de Investigación

2.6.1. Hipótesis General.

- Los tres parámetros de microinjertación influirán en el éxito del prendimiento *in vitro* de *Citrus aurantium* “naranja agria”, empleando el patrón “Citrumelo”.

2.6.2. Hipótesis Específicos.

- La edad del patrón Citrumelo, influirá en el prendimiento de microinjertos de naranja agria, permitiendo la obtención de un mayor porcentaje.
- La concentración de sacarosa influirá en el mayor porcentaje de prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo.
- Los métodos de colocación del ápice de naranja agria permitirán un mayor porcentaje de prendimiento *in vitro* de microinjertos.
- La interacción de dos o tres parámetros influirán en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo.

2.6.3. Operacionalización de Variables e Indicadores

Tabla 1.

Operacionalización de Variables e Indicadores

VARIABLES	DEFINICION	DIMENSIONES	NIVELES	INDICADORES
VARIABLE INDEPENDIENTE Tres parámetros de microinjertación	Factores que influyen el proceso de microinjertación <i>in vitro</i> .	Edad de patrón	2 semanas 3 semanas 4 semanas	-Tiempo transcurrido desde la germinación hasta su empleo en la microinjertación.
		Concentración de Sacarosa	30g/L 50g/L 70g/L	-Peso de la sacarosa en relación al volumen de la solución
		Métodos de colocación del ápice	T invertida Colocación sobre el anillo vascular	-Tipo de corte sobre el patrón -Estructura transversal del tallo del patrón
VARIABLE DEPENDIENTE Prendimiento <i>in vitro</i> de <i>Citrus aurantium</i> “naranja agria”, empleando el patrón Citrumelo	Unión exitosa entre el ápice de una especie con el patrón de otra, que le proporcionará beneficios como tolerancia a enfermedades, etc.	Prendimiento del microinjerto		-Porcentaje de prendimiento

Capítulo III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño Metodológico

3.1.1. Tipo de Investigación.

- La investigación es aplicada, puesto que permite resolver problemas partiendo de conocimientos previos (Hernández, Fernández, & Baptista, 2014), relacionados a la microinjertación de ápices caulinares, cuya técnica recientemente se está empleando en nuestro país, pero que posee bases preexistentes.

3.1.2. Nivel de investigación.

- El nivel de investigación es explicativo, ya que busca determinar las causas de los eventos o fenómenos de interés y la relación entre variables (Hernández et al., 2014), lo cual implica evaluar la influencia de parámetros en el prendimiento de microinjertos *in vitro* de *C. aurantium* utilizando el patrón Citrumelo.

3.1.3. Diseño.

- El diseño es de tipo experimental, manipulándose las variables independientes con el propósito de analizar su efecto sobre la variable dependiente (Hernández et al., 2014), para ello se empleará un análisis de varianza trifactorial que permitirá la evaluación de la influencia de los niveles de cada parámetro y de la interacción de los tres en conjunto, en el proceso de prendimiento de microinjertos.

3.1.4. Enfoque.

- El enfoque es cuantitativo dado que es un proceso secuencial donde se medirán variables y se empleará el análisis estadístico para su análisis respectivo extrayendo una serie de conclusiones por medio de las hipótesis planteadas (Hernández et al., 2014).

3.2. Población y Muestra

3.2.1. Población.

La población estuvo constituida por todas las repeticiones de las unidades muestrales (microinjertos) a evaluar.

3.2.2. Muestra.

En la presente investigación, el tamaño de muestra fue igual a 90 unidades muestrales, como se detalla a continuación:

N° de Tratamientos = (niveles de edad del patrón) (niveles de método de colocación del ápice) (niveles de concentración de sacarosa)

N° de Tratamientos = $3 \times 2 \times 3 = 18$ Tratamientos

Tamaño de muestra = N° de tratamientos x N° de repeticiones

$90 = 18 \times 5$

La muestra fue probabilística, para lo cual se seleccionó al azar, a través de un muestreo aleatorio simple, los tubos numerados que contenían cada uno de los microinjertos.

3.3. Técnicas de recolección de datos

3.3.1. Técnicas a emplear.

3.3.1.1. *Recolección del material a emplear.*

a. Semillas de Citrumelo.

Las semillas se obtuvieron de frutos de árboles provenientes del fundo Sociedad Agrícola la Pirámide – Huaral (*Figura 1*), los cuales fueron trasladados a las instalaciones del CITE Agroindustrial U.T. Huaura. Los frutos se lavaron con agua corriente y detergente comercial, se cortaron a la mitad procurando no dañar las semillas.

Las semillas se seleccionaron, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en un frasco de vidrio con 5ml de agua destilada para evitar la deshidratación.

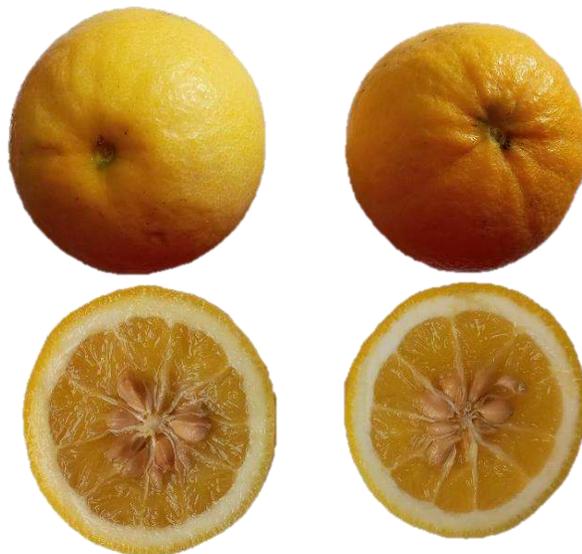


Figura 1 Frutos de Citrumelo, provenientes del fundo Sociedad Agrícola la Piramide- Huaral

b. Plantas de Naranja agria.

Se trasladaron plantas jóvenes de *C. aurantium*, provenientes del vivero frutícola “San José” de la Provincia de Huaura, los cuales se acondicionaron en el vivero del CITE Agroindustrial U.T. Huaura. Para el presente estudio se colectaron muestras de segmentos internodales de naranja agria, cortándose con ayuda de una tijera de podar, explantes con 2 a 3 nudos. Se cepillaron individualmente, evitando dañar el tejido y se sumergieron en una solución de detergente comercial agitándose vigorosamente para eliminar los residuos de polvo y otros restos adheridos a la superficie de los segmentos (*Figura 2*). Luego se enjuagaron con agua corriente y se trasladaron al laboratorio en un frasco sellado con agua destilada.

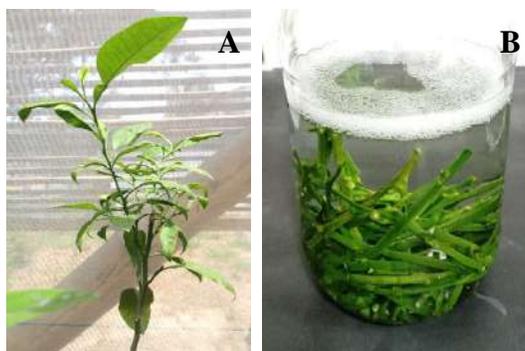


Figura 2 A. Planta joven de *C. aurantium*. B. Segmentos internodales de *C. aurantium* en solución de detergente comercial.

3.3.1.2. Preparación del Patrón: Citrumelo.

Las semillas se desinfectaron de acuerdo a lo descrito por Cantagallo, Azevedo, Schinor, Mourão Filho, & Mendes (2005), y se introdujeron en tubos que contenían medio MS, suplementado con sacarosa QP 30 g/l, solidificado con 5,7 g/l de agar, ajustándose el pH a 5,7, para su esterilización en autoclave a 121°C x 15 min. Se sellaron los tubos de ensayo con parafilm y se trasladaron al cuarto de cultivo, manteniéndose en completa oscuridad, a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se monitorearon cada cuatro días hasta observar la presencia de radícula (Figura 3), el cual fue el indicador del inicio de la germinación, lo que permitió contabilizar la edad del patrón para su empleo como patrón *in vitro*. Trascurrido el tiempo adecuado (Tabla 2), fueron empleados para el proceso propiamente dicho de microinjertación.



Figura 3 Germinación *in vitro* de semillas de Citrumelo.

Tabla 2.

Tratamientos empleados para el factor: edad del patrón

EDADES DEL PATRÓN	
Tratamientos	EDAD (Semanas)
A1*	2
A2	3
A3	4

*Control.

Fuente: Elaboración propia

3.3.1.3.Preparación del Ápice: *C. aurantium*

Para la introducción de segmentos internodales de naranja agria se empleó la desinfección mencionada por Roca & Mroginski (1991), se realizó cortes en ambos extremos del explante que estuvieran dañados producto de la exposición a los desinfectantes. Seguidamente se sembraron los explantes en tubos de ensayo conteniendo medio MS, suplementados con 30 g/l de sacarosa y 5,7 g/l de agar, ajustados a un pH de 5,7 antes de la esterilización en autoclave. Una vez sellados con parafilm, se trasladaron al cuarto de cultivo, a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16h luz, hasta la obtención de brotes del tamaño deseado (3 cm aproximadamente) para ser microinjertado.



Figura 4 Introducción de segmentos internodales de *C. aurantium*.

3.3.1.4. Microinjertación.

El proceso de microinjertación se realizó de acuerdo a lo descrito por Navarro et al (1975), empleándose para el presente estudio, dos métodos de colocación del ápice (Tabla 3). En cámara de flujo laminar y con ayuda de un estereocopio, se procedió a realizar los cortes respectivos del patrón teniendo en cuenta el tipo de incisión así como la estructura transversal del tallo para la adecuada posición del ápice (Figura 5), así mismo para los brotes de naranja agria, se eliminaron las hojas y se mantuvo el domoapical con hasta 2 primordios foliares con un tamaño aproximado de 0.15 mm (Figura 6).

Tabla 3.

Tratamientos empleados en el método de colocación del ápice.

MÉTODOS DE COLOCACION DEL ÁPICE	
Tratamientos	Métodos
B1*	T invertida
B2	Colocación sobre el anillo vascular

*Control.

Fuente: *Elaboración propia*

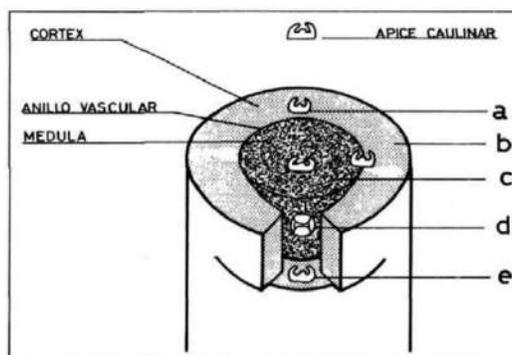


Figura 5 Tipos de injerto *in vitro*.

Nota: la imagen hace referencia a los diferentes tipos de injertos *in vitro*, para el presente estudio se emplearon 2 de ellos (b y e). Tomado de Navarro (1975).

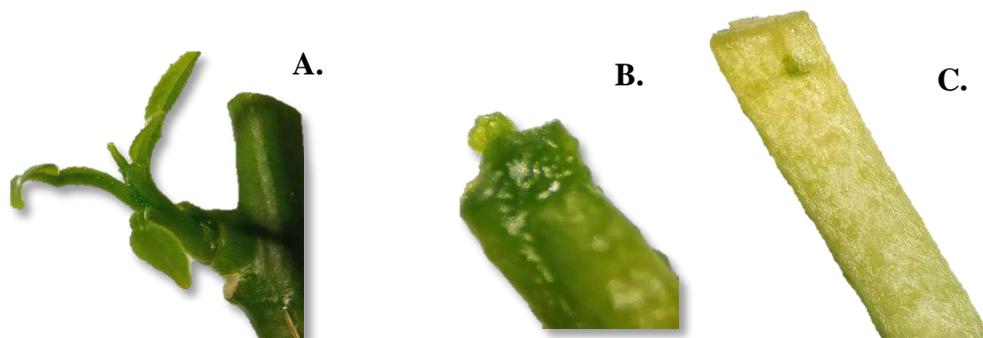


Figura 6 Proceso de microinjertación *in vitro*. A. Brote de naranja agria. B. Ápice caulinar de naranja agria. C. Ápice caulinar, microinjertado en patrón Citrumelo, por técnica de T invertida

Una vez insertados los ápices caulinares en los patrones, se sembraron en tubos con medio líquido MS (1962) (Anexo 1), suplementado con vitaminas White (1963) (Anexo 2), los cuales presentaban un papel filtro como soporte, y diferentes concentraciones de sacarosa (Tabla 4). El pH se ajustó a 5,7. Se monitoreó semanalmente, durante tres meses, eliminándose los brotes adventicios del patrón de ser necesario y se evaluó el porcentaje de prendimiento, presencia de ápices caulinares muertos y formación de callos relacionados al método de colocación. En cuanto a la concentración de sacarosa, también se evaluó el porcentaje de prendimiento, el número de hojas y la longitud de las mismas.

Tabla 4.

Tratamientos empleados para la concentración de sacarosa.

CONCENTRACIÓN DE SACAROSA	
Tratamientos	Concentración (mg/L)
C1*	30
C2	50
C3	70

*Control.

Fuente: Elaboración propia

3.4. Técnicas para el procesamiento de la información

Se empleó un diseño experimental factorial con tres factores, para evaluar la influencia de los niveles de cada parámetro de microinjertación y la influencia de interacción entre ellos, en el proceso de prendimiento *in vitro* (Tabla 5). Se emplearon 5 repeticiones por tratamiento, siendo cada microinjerto realizado, una unidad experimental, obteniendo un tamaño de muestra de 90 unidades muestrales.

Tabla 5.

Diseño Factorial con tres factores

VARIABLES Y NIVELES					
Edad del patrón	Método de colocación del ápice	Concentración de sacarosa			
		C			
Nivel		Nivel	C1	C2	C3
A	B	B1	A1B1C1*	A1B1C2	A1B1C3
		B2	A1B2C1	A1B2C2	A1B2C3
		B1	A2B1C1	A2B1C2	A2B1C3
		B2	A2B2C1	A2B2C2	A2B2C3
		B1	A3B1C1	A3B1C2	A3B1C3
		B2	A3B2C1	A3B2C2	A3B2C3

Fuente: Elaboración propia

Se empleó el software R, versión 4.2.1, utilizando los paquetes phia, Car y DescTools en la interfaz Rstudio, con un nivel de confianza del 95 %; se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Prueba Post Hoc de Dunnett.

Capítulo IV: RESULTADOS

4.1. Prendimiento *in vitro* de microinjertos de *C. aurantium* sobre el patrón Citrumelo

Se observó prendimientos a partir de los 16 días de realizado los microinjertos, considerándose como prendimientos aquellos ápices caulinares que lograron desarrollar hojas por otro lado los recambios de los medios de cultivo se realizaron a los 30 y 60 días con el fin de mantener disponible los nutrientes del medio y a su vez, eliminar los brotes adventicios de los patrones (Figura 7). La evaluación obtenida a los 90 días, fue considerada en el presente estudio para los análisis estadísticos correspondientes.

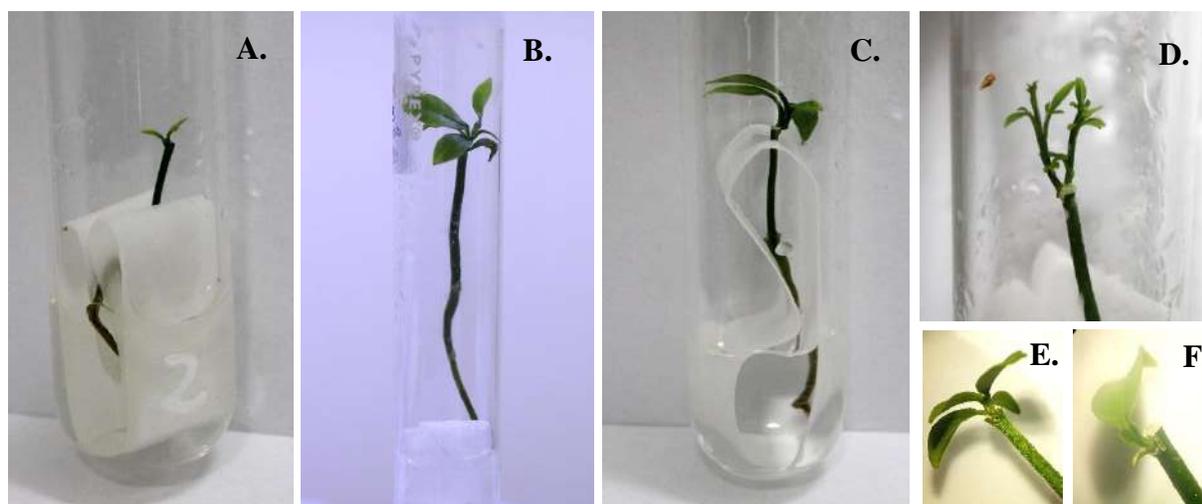


Figura 7 Prendimiento *in vitro* de microinjertos de *C. aurantium* empleando el patrón Citrumelo. A., B. y C. Microinjertos prendidos. D. Brotes adventicios del patrón (hojas trifoliadas). E. Microinjerto por método de colocación sobre el anillo vascular. F. Microinjerto con T invertida.

Se obtuvo 13.3% de microinjertos prendidos de un total de 90 microinjertos realizados, los cuales se desarrollaron en 8 de los 18 tratamientos evaluados (Anexo 3). Para el presente estudio, 10 tratamientos evaluados no presentaron ningún prendimiento exitoso.

4.1.1. Influencia de la edad del patrón en el prendimiento in vitro.

Para la variable edad del patrón se consideraron tres niveles: 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas, a partir de su germinación *in vitro*, obteniéndose 10, 13.3 y 16.6 % de prendimientos respectivamente, sin embargo dicho factor, no fue significativo estadísticamente (Anexo 4), no presentando influencia en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de *C. aurantium* sobre el patrón Citrumelo.

4.1.2. Influencia de la concentración de sacarosa en el prendimiento in vitro.

Para la variable concentración de sacarosa se consideraron tres concentraciones: 30, 50 y 70 g/l, siendo estadísticamente significativo su influencia en el prendimiento *in vitro* (Anexo 5). Así mismo, se puede observar que solo existe diferencia significativa entre la concentración de 70g/l con la concentración de 30 g/l (Anexo 6), obteniéndose 26.6 % y 6.6 % de prendimientos respectivamente.

4.1.3. Influencia de los métodos de colocación del ápice en el prendimiento in vitro.

Se emplearon dos métodos de colocación: T invertida y sobre el anillo vascular, obteniendo 13.3 % de microinjertos prendidos para cada uno. Se determinó que la influencia de dicha variable no fue estadísticamente significativa para el prendimiento *in vitro* (Anexo 7).

4.1.4. Influencia de la interacción de dos parámetros de microinjertación en el prendimiento in vitro.

Se evaluaron las interacciones, agrupando cada dos parámetros considerados en el presente estudio y se determinó que la interacción entre la edad del patrón y el método de colocación del ápice, influyen de manera conjunta en el prendimiento *in vitro* de *C. aurantium* sobre el patrón Citrumelo (Anexo 8) , sin embargo, la interacción de la concentración de sacarosa con el método

de colocación del ápice (Anexo 9), así como con la edad del patrón (Anexo 10), no presentaron una interacción significativa, no influyendo en el prendimiento *in vitro*.

4.1.5. Influencia de la interacción de tres parámetros de microinjertación en el prendimiento *in vitro*.

Se evaluó la influencia de los tres parámetros de microinjertación considerados en el presente estudio, observándose que la combinación de los tres factores presentaba una significancia mayor a 0.05 en la prueba ANOVA del diseño factorial 3x3, por lo cual no influirían en el prendimiento *in vitro* de *C. aurantium* sobre el patrón Citrumelo, de manera conjunta (Anexo 11).

Capítulo V: DISCUSIÓN

5.1. Discusión de resultados

El prendimiento *in vitro* en el presente estudio se determinó a los 90 días tomando como base lo reportado por Suárez (2021), que realizó su evaluación a las 10 semanas de realizado su microinjertación; además se consideraron como microinjertos prendidos, solo aquellos que mostraron desarrollo de hojas, ya que existían ápices caulinares que se encontraban vivos, pero que a pesar de los recambios, no lograron desarrollarse. Zamora et al. (2015) consideró como microinjertos prendidos, aquellos que mantuvieron sus ápices en buen estado (vivos y verdes) durante 4 semanas, sin embargo el 39.29% del total de sus microinjertos logrados, no mostró crecimiento, asociándolo a las características del patrón, condiciones ambientales, entre otros.

Por otro lado, se observó que luego del primer y segundo recambio, donde se renovó el medio de cultivo y se eliminaron los brotes adventicios del patrón, el porcentaje de prendimiento se incrementó en algunos tratamientos, ya que tal como menciona Morin et al (1980), los brotes del patrón compiten con el ápice microinjertado, produciendo la disminución del vigor y su desarrollo, por lo que se sustenta que dicho proceso es necesario.

Respecto al porcentaje de prendimiento obtenido, según Navarro (1975), la edad del patrón influye en el éxito de los microinjertos, siendo los patrones más jóvenes (2 semanas), los que permiten un mayor prendimiento, pero una mayor formación de callos, sin embargo en el estudio realizado, la edad del patrón no fue significativa, obteniéndose porcentajes similares para cada una de las edades estudiadas, así mismo, Singh, et al. (2018), reportaron porcentajes de entre 34 – 58% para microinjertos de edades menores, los cuales son porcentajes mayores a los obtenidos en la presente investigación, debido probablemente a otros factores externos que también influyen en la microinjertación *in vitro*.

En cuanto a la concentración de sacarosa, Naz, et al. (2007), determinaron que la sacarosa influía en el prendimiento *in vitro* de sus microinjertos, mostrando que conforme aumentaba la concentración de sacarosa, se incrementaba del porcentaje de microinjertos logrados para los dos cultivares que emplearon, resultados similares se obtuvieron en el presente estudio, donde la mayor concentración de sacarosa 70 g/l, permitió un mayor porcentaje, frente a los demás tratamientos, a pesar de ello, los porcentajes alcanzados, no fueron altos, contrastados con lo obtenido por Singh, et al. (2018), que menciona que al tratar previamente con reguladores de crecimiento como BAP o IAA, el porcentaje de microinjertos se incrementó, lo que posiblemente se relacione a que algunas auxinas permiten la formación del sistema vascular del meristemo como menciona Llihua (2018).

Sobre los métodos de colocación empleados, a diferencia de lo obtenido por Naz, et al. (2007), en la presente investigación ninguno mostró influencia alguna sobre el prendimiento *in vitro*, sin embargo el método de T invertida, supone para investigadores como Navarro (1975), un mejor método, al presentar menor desarrollo de brotes adventicios de los patrones.

Para la interacción entre el método de colocación y la concentración de sacarosa, Naz, et al. (2007), tampoco obtuvo resultados significativos, al igual que Llihua (2018), cuya interacción entre la concentración de sacarosa y la presencia de cotiledones, no presentó influencia en el prendimiento de microinjertos de limón Eureka y de naranja Washington Navel sobre Citrange Troyer, tanto para el porcentaje de prendimiento, como para el número y longitud de hojas, mostrando que los factores influyen de manera independiente en tratamientos puntuales.

Para el presente estudio, la interacción de la edad del patrón y el método de colocación, que si mostraron influencia de manera conjunta en el prendimiento de microinjertos de *C. aurantium*

sobre el patrón Citrumelo, posibilita una mayor experimentación de sus tratamientos, además se debe tener en cuenta que existen otros factores que influyen en el proceso de microinjertación *in vitro*, como la compatibilidad del patrón con el ápice, el empleo de reguladores de crecimiento como se mencionó anteriormente, el diámetro del patrón, etc, los cuales requieren ser tomados en consideración.

Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- La edad del patrón Citrumelo no influye significativamente en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria.
- La concentración de sacarosa influye significativamente en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria, sobre el patrón Citrumelo, encontrándose diferencia significativa entre la mayor concentración empleada (70 g/l) con la menor concentración (30g/l) de sacarosa.
- Los métodos de colocación del ápice de naranja agria no influyen significativamente en el prendimiento *in vitro* de microinjertos, sobre el patrón Citrumelo.
- La interacción de dos parámetros de microinjertación (edad del patrón y método de colocación), influyen en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria, permitiendo un mayor porcentaje de prendimiento.
- La interacción de los tres parámetros de microinjertación (edad del patrón, método de colocación y concentración de sacarosa), no influyen en el prendimiento *in vitro* de microinjertos de naranja agria sobre el patrón Citrumelo.

6.2. Recomendaciones

- Emplear patrones de mayor diámetro, para facilitar la manipulación de los microinjertos y evaluar su influencia en el proceso de microinjertación *in vitro*.
- Tener en cuenta, los tiempos de germinación del patrón y la brotación del injerto, para lograr la unión sin pérdida de material.

- Realizar diferentes ensayos que permitan evaluar la compatibilidad de microinjertos de naranja agria sobre otros patrones utilizados en cítricos.

- Evaluar otros parámetros de microinjertación que pudiesen afectar el prendimiento *in vitro* de naranja agria, el estudio de los mismos permitirá mejorar el proceso de microinjertación elevando el porcentaje de prendimiento.

REFERENCIAS

7.1. Fuentes Bibliográficas

- Almeida, W., Mourão-Filho, F., Mendes, B., & Rodriguez, A. (2002). *In vitro* organogénesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C.limonia*. *Sci. Agric.*, 59(1): 35-40.
- Bordón, Y., Guardiola, J., & García-Luis, A. (2000). Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of Citrus Rootstocks. . *Ann. Bot.*, 86: 159-166.
- Cantagallo, F. D., de Azevedo, F. A., Schinor, E. H., Filho, F. D., y Mendes, B. M. (2005). Micropropagação de citrumelo'Swingle'pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27(1), 136-138.
- Chagolla, J. (1990). Cultivo de cítricos in vitro. *FIRA*, 22(217), 12.
- Cortés, R. (2004). *Adaptación de la técnica de Microinjección in vitro de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck) y Citrumelo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus paradisi.* Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Cueva, J. (2015). *Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y el ácido giberélico (AG₃) en el enraizamiento in vitro y aclimatación en condiciones de invernadero de Senecio calvus Cuatr. (Huamanripa).* (Tesis de pregrado).Huaraz: Universidad Nacional Santiago Antúnez De Mayolo.
- Delfino, M., y Buffa, L. (2008). Afidos en Plantas Ornamentales de Córdoba, Argentina (Hemiptera:Aphididae). *Scielo*, 74-80.

- Martínez-Hernández, M. D. J., Alonso López, A., Osorio-Acosta, F., Gallardo López, F., López Moctezuma, H., & Mata Rosas, M. (2006). Cultivo in vitro de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia*, 31(8), 616-619.
- Hernández, S. (1996). Obtención de plantas de cítricos libres de enfermedades transmisibles por injerto. *Serie Aqua*, 7-9.
- Hernández-Amasifuen, A. D., Pineda-Lázaro, A. J., & Díaz-Pillasca, H. B. (2021). Micropropagación in vitro de naranja agria (*Citrus aurantium L.*) a partir de segmentos nodales. *Bionatura*, 6(4), 2216–2221. <https://doi.org/10.21931/rb/2021.06.04.13>
- Iglesias, L., Rojas, P., & Enríquez, J. (2001). Utilización de las técnicas biotecnológicas en los programas de prevención del virus de la tristeza de los cítricos en el estado de Veracruz. *Cuadernos de Biodiversidad*(6), 6-11.
- Jordán, M., y Casereto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En F. Squeo, & C. L., *Fisiología Vegetal* (Vol. 15, págs. 1-28). La Serena: Edición Universidad de La Serena.
- Le, M.-L., Sakai, K., Mizunoe, Y., Ozaki, Y., & Wakana, A. (2020). Evaluation of Seedlings from 11 Accessions for In Vivo Micrografting. *The Horticulture Journal*. 1-11
- Lihua, L. (2018). *Efecto de la sacarosa y cotiledones sobre el prendimiento de microinjertos in vitro de naranja y Limón (Citrus sp) (Tesis de pregrado)*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., . . . Liu, Y. (2015). Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*, 9(68), 1-14.
- Moreira-Dias, J., Molina, R., Bordón, Y., Guardiola, J., & Garcia-Luis, A. (2000). Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. *Ann. Bot.* , 85:103–110.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murashige, T., W, B., Rangan, E., Naver, C., Roistacher, C., & Holliday, P. (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *HortScience*, 7, 118-119.
- Navarro, L., Roistacher, C., & Murashige, T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100(5), 71-479.
- Naz, Ali & Jaskani, Muhammad & Abbas, Haider & Qasim, And. (2007). In vitro studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. *Pakistan Journal of Botany*. 39. 1773-1778.
- Paino, B., & Donovan, J. (2012). Demanda por frutos amazónicos en el mercado de Lima , Perú. *World Agroforestry Centre (ICRAF)*, 1–36.

- Perla, H. (2007). *Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal Piper oradendron Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo in vitro.* (Tesis de Pregrado). Guatemala.
- Pierik, R. (1999). *Cultivo in vitro de las plantas superiores.* España.
- Reyes Aranda, P. M. (2016). *Atributos de la gastronomía tradicional del pueblo de moche, para el desarrollo del turismo gastronómico* (Tesis de Pregrado) Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo.
- Rivera-Cruz, M. d., Trujillo-Narcía, A., & Alejo, D. (2010). Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo agrio *Citrus aurantium* L. *Interciencia*, 35(2), 113-119.
- Roca, W., y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones.* Colombia .
- Román, L. (2006). *Norte Chico-Lima, Paisaje y Gastronomía.* Lima: San Marcos.
- Rosabal Pérez, Dielis, Marisel Bahí Arevish, Yanexis Yayma Fonseca Carrasco, and Juan José Silva Pupo. 2021. "Establishment and in Vitro Multiplication of Citrus Aurantium." *Revista Granmense de Desarrollo Local* 5(3):288–300.
- Segun, P. A., Ismail, F. M. D., Ogbale, O. O., Nahar, L., Evans, A. R., Ajaiyeoba, E. O., & Sarker, S. D. (2018). Acridone alkaloids from the stem bark of *Citrus aurantium* display selective cytotoxicity against breast, liver, lung and prostate human carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 131–138.

Singh, A. K., Meetei, N. T., Kundu, S., Salma, U., & Mandal, N. (2019). In vitro micrografting using three diverse indigenous rootstocks for the production of Citrus tristeza virus-free plants of Khasi mandarin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(2), 180-189.

Suárez, Isidro E.; Álvarez, Cristian; López, Claudia (2021) Micrografting of Valencia orange and Tahiti lime. *Temas Agrarios*, 26 (1), 26-35.

Tallón, C. (2015). Biotecnología Aplicada a la mejora genética de patrones de cítricos puesta a punto de un protocolo de micropropagación y regeneración adventicia para su utilización en la generación de líneas mutantes tolerantes a la salinidad. Murcia: Universidad de Murcia.

Tallón, C., Porras, I., & Pérez-Tornero, O. (2012). Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 488-499.

Tirabante, N. (2018). *Microinjerto de ápices caulinares in vitro para saneamiento de "virus de la tristeza de cítricos" (CTV) en Tangelo minneola "tangelo" y Citrus limon variedad eureka "limón"*. (Tesis de Pregrado). Piura: Universidad Nacional de Piura.

Vanegas, H., Zamora, L., & Vargas, J. (2004). Microinjertación in-vitro en cítricos a escala comercial en el valle del Cauca. *Fitotecnia Colombiana*, 4(1), 80-85.

Zamora, Victoria, Maritza Luís, Inés Peña, Xenia Ferriol, and Lester Hernández. 2015. "Uso Del Microinjerto in Vitro de Ápices Caulinares Para Eliminar Candidatus Liberibacter Asiaticus en Cultivares de Cítricos En Cuba." *Protección Vegetal* 30(2):123-32.

Zegarra, K. (2014). *Establecimiento in vitro de Yemas y Efecto de Reguladores de Crecimiento ANA y BAP en la Micropropagación de Polylepis rugulosa (Queñua) de Zonas Altoandinas de Arequipa*. (Tesis de pregrado). Arequipa: Universidad Católica de Santa María.

7.2. Fuentes Hemerográficas

Agustí, M., y Almela, A. (1991). *Aplicación de fitoreguladores en citricultura*. Barcelona: Aedos.

Ancillo, G., y Medina, A. (2014). *Los Citricos*. Valencia: Gráficas Mare Nostrum, S. L

Gravina, A., y Piestun, D. (1991). Formación de un banco de variedades de Citrus libre de virus: I. Obtención de plantas mediante la técnica de microinjerto. *Boletín de Investigación*, 15.

Madariaga, M. (2017). *Tristeza de los cítricos*. La Pintana: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).

Morín, C. (1985). *Cultivo de Cítricos*. 2da. Edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Sánchez, M. (2012). *Asistencia técnica dirigida en el riego tecnificado en el cultivo de cítricos*. Lima: Oficina Académica de Extensión y Proyección Social - UNALM (OAEPS).

Vázquez, L., & Ortiz, M. (2019). *Redagrícola Una conversación técnica sobre agricultura*. pp. 1–64.

Vegas, U. y Narrea, M. (2011). *Manejo Integrado del Cultivo*. Sullana.

7.3. Fuentes Electrónicas

Anderson, C., Banfi, G., Beñatena, H., Casafus, C., Costa, N., Danos, E., ... Vazquez, D. (1996).

Portainjertos. Manual Para Productores de Naranja y Mandarina de La Región Del Río Uruguay, 1–6. Recuperado de https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_manual_citricultura_cap6.pdf

Coloma Porcari, C. (2010). La Comida Tradicional del Perú en la Obra de Ricardo Palma.

Recuperado de <http://repositorio.cultura.gob.pe/handle/CULTURA/224>

Hernández Sampiere, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2014).

Metodología de la Investigación. Recuperado de <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>

IICA. (2014). *Desarrollo de los agronegocios en América Latina y el Caribe*. Recuperado de

<http://repiica.iica.int/docs/B3255E/B3255E.PDF>

MINAGRI. (5 de noviembre del 2018). MINAGRI inicia proyectos de investigación y

transferencia en cultivos de agroexportación – Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Recuperado de <https://www.inia.gob.pe/2018-nota-168/>

Municipalidad Provincial de Huaura. (2013). Diagnostico ambiental local de la Provincia de

Huaura. Huacho. Recuperado de siar.minam.gob.pe

Navarro, L., y Juarez, J. (2005). Microinjerto de ápices caulinares de cítricos. Phytoma.

Recuperado de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/170-junio-julio-2005/microinjerto-de-pices-caulinares-de-ctricos-in-vitro>

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Zaid, A., Hughes, H., Porceddu, E., & Nicholas, F. (2004). *Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/y2775s/y2775s00.htm#Contents>

Zapata Acha, S. (2013). Recetarios y textos culinarios peruanos del siglo XIX. *Boletín de Lima*, 171, 43–61. Recuperado de <http://biblioteca.herdez.com.mx/pdf/Recetarios.pdf>

ANEXOS

Anexo 1

Composición de medio Murashigue Skoog (1962)

Composición	Concentración (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KI	0.75
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·7H ₂ O	22.3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	27.85
Na-EDTA·2H ₂ O	37.3

Anexo 2

Vitaminas White (1963)

Composición	Concentración (mg/L)
Glicina	4.0
Tiamina-HCl	0.2
Piridoxina-HCl	1.0
Ácido nicotínico	1.0
Myo-inositol	200

Anexo 3

Resultados de prendimiento de microinjertos *in vitro*, expresados en promedio de porcentaje de prendimiento

TRATAMIENTOS						
Edad del patrón (semanas) (A)	Método de colocación del ápice (B)	Concentración de sacarosa (g/l) (C)	N° de repeticiones	N° de prendimientos	% de prendimiento	Promedio de % de prendimiento
2		30	5	0	0	0
2	T invertida	50	5	0	0	0
2		70	5	3	60	12
2	Sobre el anillo vascular	30	5	0	0	0
2		50	5	0	0	0
2		70	5	0	0	0
3		30	5	0	0	0
3	T invertida	50	5	0	0	0
3		70	5	0	0	0
3	Sobre el anillo vascular	30	5	1	20	4
3		50	5	1	20	4
3		70	5	2	40	8
4		30	5	1	20	4
4	T invertida	50	5	0	0	0
4		70	5	2	40	8
4	Sobre el anillo vascular	30	5	0	0	0
4		50	5	1	20	4
4		70	5	1	20	4

Anexo 4

Prueba ANOVA para los niveles del factor edad del patrón

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_edad	27	2	13.330	0.281	0.75600
Residuals	4133	87	47.51		

Anexo 5

Prueba ANOVA para los niveles del factor concentración de sacarosa

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_edad	320	2	160.000	3.625	0.03080
Residuals	3840	87	44.14		

Anexo 6

Prueba Post Hoc de Dunnett para concentración de sacarosa

Concentración de sacarosa	diff	lwr.ci	upr.ci	pval
50-30	0	-3.8572	3.8572	1.000
70-30	4	0.1427	7.8572	0.0409

Anexo 7

Prueba ANOVA para los niveles del factor método de colocación del ápice

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_edad	0	1	0.000	0	1.00000
Residuals	4160	88	4160		

Anexo 8

Prueba ANOVA para las interacciones de los niveles de los 2 factores (edad del patrón y método de colocación del ápice).

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_edad	26.7	2	13.333	0.2958	0.74473
f_colocacion	0.0	1	0.000	0.0000	1.00000
f_edad:f_colocacion	346.7	2	173.333	3.8451	0.02525
Residuals	3786.7	84	45.079		

Anexo 9

Prueba ANOVA para las interacciones de los niveles de los 2 factores (colocación del ápice y concentración de sacarosa)

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_colocacion	0	1	0.000	0	1.00000
f_sacarosa	320	2	160.000	3.6	0.03162
f_colocacion:f_sacarosa	106.7	2	53.333	1.2	0.30630
Residuals	3733.3	84	44.444		

Anexo 10

Prueba ANOVA para las interacciones de los niveles de los 2 factores (edad del patrón y concentración de sacarosa)

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_edad	26.7	2	13.333	0.2872	0.75110
f_sacarosa	320.0	2	160.000	3.4468	0.03659
f_edad:f_sacarosa	53.3	4	13.333	0.2872	0.88548
Residuals	3760.0	81	46.420		

Anexo 11

Prueba ANOVA para las interacciones de los niveles de los 3 factores

F.V.	SC	gl	CM	F	Pr (>F)
f_edad	26.67	2	13.333	0.3158	0.73022
f_colocacion	0.00	1	0.000	0.0000	1.00000
f_sacarosa	320.00	2	160.000	3.7895	0.02724
f_edad:f_colocacion	346.67	2	173.333	4.1053	0.02049
f_edad:f_sacarosa	53.33	4	13.333	0.3158	0.86654
f_colocacion:f_sacarosa	106.67	2	53.333	1.2632	0.28895
f_edad:f_colocacion:f_sacarosa	266.67	4	66.667	1.5789	0.18915
Residuals	3040.00	72	42.222		