

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE INGENIERIA AGRONÓMICA



Respuesta de tres especies de *Citrus* a fitorreguladores de crecimiento en la propagación *in vitro*.

Murillo Borrero Kevin Brayan

Santos Hoyos Mercy Adriana

Universidad Técnica de Manabí
Facultad de Ingeniería Agronómica
Carrera de Agronomía
Santa Ana, Ecuador

2021

Respuesta de tres especies de *Citrus* a fitorreguladores de crecimiento en la propagación *in vitro*.

Murillo Borrero Kevin Brayan
Santos Hoyos Mercy Adriana

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero Agrónomo

Tutor (a):

Ing. Liliana Corozo Quiñonez, PhD

Revisor (a):

Ing. Fernando Sánchez Mora, PhD

Línea de Investigación:

Soberanía y seguridad alimentaria

Mejoramiento genético y biotecnología vegetal

Universidad Técnica de Manabí

Facultad de Ingeniería Agronómica

Carrera de Agronomía

Santa Ana, Ecuador

2021

DEDICATORIA

A mis Padres

El esfuerzo y las metas alcanzadas reflejan la dedicación y el amor que invierten los padres en sus hijos. Gracias a mis padres son quien soy, orgullosamente agradezco al Sr. George Murillo y la Sra. Francisca Borrero, por ser pilares importantes en mi vida, por demostrarme su cariño, por sus consejos, apoyo incondicional y ayuda en los momentos difíciles. Siendo los responsables de la persona que soy; por sus valores, principios, perseverancia he llegado alcanzar esta meta.

A mis familiares

En especial a la Sra. Blanca Mera, el Sr. Joel Murillo, la Sra. Letty Borrero, a la Srta. María Olvides a la Srta. Evaluna Mendoza quien ha sido mi apoyo fundamental, por motivarme a seguir adelante.

“Por ellos y para ellos”

Brayan Murillo

AGRADECIMIENTO

A mis padres Sr. George y Sra. Francisca por todo su amor, por el esfuerzo, dedicación, paciencia, por su confianza y por todo lo que me han dado a lo largo de mi carrera y de mi vida. A la Facultad de Ingeniería Agronómica, al personal docente y de campo que con sus conocimientos impartidos en las aulas y fuera de ellas, han colaborado en mi formación personal y profesional.

Mi sincero agradecimiento a la Ing., Mg. Sc, Liliana Corozo y a la Ing. Fátima Macías por depositar su confianza y toda su predisposición durante la realización de este trabajo. Especial reconocimiento merece mi compañera y amiga de trabajo de titulación Mercy Santos, ya que juntos hemos logrado alcanzar esta meta, a Alejandro Barcia, Fernando Ferrin, Elizabeth Mieles y Yelitza Cobeña, por su apoyo incondicional en la elaboración de este proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos con los que a través del tiempo fuimos fortaleciendo una amistad y creando una familia, muchas gracias por toda su colaboración, por compartir experiencias durante este largo camino.

Y a todos quienes aportaron de una u otra forma durante mi formación profesional y vida personal.

Brayan Murillo

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, a mis extraordinarios Padres, Jhonny Santos y Mercy Hoyos por su noble dedicación y amor, por ser mis mejores amigos, mis consejeros, por siempre guiarme y ser la voz y bendición de Dios como prioridad en mi vida. A mis hermanas Dianita y Linda, a mi mamita Marianita Cobeña y demás familiares por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida. A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

Los llevo siempre en el corazón.

Mercy Santos

AGRADECIMIENTO

Agrdezco a Dios por su infinita bondad, por haberme otorgado una familia maravillosa, por haberme permitido culminar una de mis metas, y porque tengo la certeza y el gozo de que siempre va a estar conmigo.

A mis Padres, Jhonny y Mercy por ser los mejores, por haber estado conmigo apoyándome en los momentos difíciles, por ser mis mejores amigos, por demostrarme el verdadero significado de la palabra amor y unión familiar, por darme excelentes consejos en mi caminar diario. A mis hermanas, Dianita y Linda por ser parte importante de mi vida, por brindarme su amor y su valiosa amistad. A mi Mamita Marianita por su apoyo, cariño y amor incondicional, por ser una excelente mujer, tan fuerte y dulce a la vez.

A todos los docentes de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación profesional, de manera especial, a la Ing. Liliana Corozo Mg. Sc, y a la Ing. Fátima Macías quienes nos han guiado con su paciencia y conocimientos. A mi amigo y compañero de tesis Brayan Murillo, por todo su apoyo, esfuerzo y dedicación en la elaboración de este proyecto de investigación.

A mis amigos Boris, Yelitza, Priscila, Estefania, Dayana, Dianita, Paola, Roxana y Dianita, por ser los mejores, por compartir tantas tristezas y alegrías, por mantener esta bonita amistad.

Finalmente, a todas aquellas personas, que me brindaron su apoyo, tiempo e información para el logro de mis objetivos.

Mercy Santos

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ, Ph.D Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**RESPUESTA DE TRES ESPECIES DE CITRUS A FITORREGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO.***”, es trabajo original realizado por los estudiantes **MURILLO BORRERO KEVIN BRAYAN** y **SANTOS HOYOS MERCY ADRIANA**, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ, Ph.D.

DIRECTORA DE TRABAJO

CERTIFICACIÓN DEL REVISOR DE TRABAJO

Ing. FERNANDO SÁNCHEZ MORA, Ph.D Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**RESPUESTA DE TRES ESPECIES DE CITRUS A FITORREGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO.***”, es trabajo original realizado por los estudiantes **MURILLO BORRERO KEVIN BRAYAN** y **SANTOS HOYOS MERCY ADRIANA**, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. FERNANDO SÁNCHEZ MORA, Ph.D.

REVISOR DE TRABAJO

CERTIFICACIÓN DE LA COMISIÓN DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN

Sometida a consideración del Tribunal de Seguimiento y Evaluación, legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADA POR:

Ing. Presidente del tribunal de sustentación

Ing. Miembro del tribunal de sustentación

Ing. Miembro del tribunal de sustentación

DECLARACIÓN SOBRE DERECHO DE AUTOR

La responsabilidad de las ideas, resultados conclusiones de la presente investigación, corresponden únicamente a los autores.

MURILLO BORRERO KEVIN BRAYAN

SANTOS HOYOS MERCY ADRIANA

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. MARCO REFERENCIAL	5
3.1. Origen y distribución.....	5
3.2. Clasificación botánica	5
3.3. Descripción morfológica.....	6
3.3.1. <i>Citrus sinensis</i> L.....	6
3.3.2. <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	6
3.3.3. <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	7
3.4. Importancia económica y nutricional de los cítricos.....	7
3.5. Propagación de los cítricos.....	8
3.6. Cultivo de tejidos	8
3.7. Micropropagación	9
3.8. Importancia de la micropropagación.....	9
3.9. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de cítricos.....	9
3.10. Etapas de la micropropagación	9
3.10.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal	10
3.10.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo	10
3.10.3. Etapa 2: Multiplicación	10
3.10.4. Etapa 3: Enraizamiento.....	10
3.10.5. Etapa 4: Aclimatación	11
3.11. Medio de cultivo	11
3.12. Fitorreguladores de crecimiento.....	12
3.12.1. Auxinas	12

3.12.2. Citoquininas.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Localización del ensayo	16
4.2. Material vegetal.....	16
4.3. Metodología	16
4.3.1. Fase I. Selección y desinfección de semilla para el establecimiento <i>in vitro</i> de tres especies de <i>Citrus</i>	16
4.3.1.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de tres especies de <i>Citrus</i> . 17	
4.3.2. Fase II: Multiplicación <i>in vitro</i>	18
4.3.3. Fase III: Enraizamiento <i>in vitro</i>	20
5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
5.1. Análisis estadístico.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1. Establecimiento <i>in vitro</i>	25
6.2. Multiplicación <i>in vitro</i>	26
6.3. Enraizamiento <i>in vitro</i>	26
7. CONCLUSIONES	42
8. RECOMENDACIONES	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
10. ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores en estudio para fases de multiplicación y enraizamiento...	21
Tabla 2. Tratamientos para la multiplicación <i>in vitro</i> de tres especies de cítricos.	22
Tabla 3. Tratamientos para el enraizamiento <i>in vitro</i> de dos especies de cítricos.	23
Tabla 4. Porcentaje de contaminación y días a la germinación de las semillas.	25
Tabla 5. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de <i>Citrus</i> multiplicadas <i>in vitro</i> .	27
Tabla 6. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) y de los testigos por cada especie sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de <i>Citrus</i> multiplicadas <i>in vitro</i> .	29
Tabla 7. Efecto de la interacción doble (especie x fitorregulador/ especie x dosis/ fitorregulador x dosis) sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de <i>Citrus</i> multiplicadas <i>in vitro</i> .	31
Tabla 8. Efecto simple de los factores especie, fitorregulador y dosis sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de <i>Citrus</i> multiplicadas <i>in vitro</i> .	33
Tabla 9. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) sobre el número de raíces y longitud de raíces de dos especies de <i>Citrus</i> enraizadas <i>in vitro</i> .	34
Tabla 10. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) y de los testigos por cada especie sobre el número de raíces y longitud de raíces de dos especies de <i>Citrus</i> enraizadas <i>in vitro</i> .	36
Tabla 11. Efecto de la interacción doble (especie x fitorregulador/ especie x dosis/ fitorregulador x dosis) sobre el número de raíces y longitud de raíces de dos especies de <i>Citrus</i> enraizadas <i>in vitro</i> .	38

Tabla 12. Efecto simple de los factores especie, fitorregulador y dosis sobre el número de brotes, longitud de brotes y diámetro de brotes de tres especies de <i>Citrus</i> enraizadas <i>in vitro</i>	40
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Selección de árboles de cítricos. B) Colecta de fruto de cítricos. C) Desinfección de frutos. D) Remoción de semillas. E) Semillas extraídas de cada variedad F) Remoción de testa de semillas.....;Error! Marcador no definido.

Figura 2. A) Preparación de medios MS. B) Semillas establecidas en medio MS C) Semillas coladas en cámara de crecimiento.18

Figura 3. A) Plántula de siete semanas para toma de ápices. B) Extracción de ápices. C) Ápices de 3 especies de cítricos D) Establecimiento de ápices de 3 especies de cítricos. E) Tratamientos en cámara de crecimiento.19

Figura 4. A) Preparación de medio MS suplementado con diferentes fitorreguladores B) Plántulas de la fase de multiplicación. C) Extracción de ápice. D) Ápices utilizados para el enraizamiento. E) Establecimiento de ápices para el enraizamiento. F) Tratamientos establecidos en cámara de crecimiento.....20

RESUMEN

El género *Citrus* se cultiva en más de 140 países, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, representando uno de los cultivos frutales más importantes, en términos de valor económico y nutrición humana. El cultivo *in vitro* de tejidos es una herramienta que permite la propagación fiable de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de fitorreguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de tres especies de *Citrus* (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantiifolia*). Se estableció un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial (AxBxC)+1, aplicando la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,05$) para las medias de los tratamientos. La micropropagación fue realizada en tres fases: 1) fase de establecimiento: las semillas de cada especie fueron colocadas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y se evaluó los días de la germinación y contaminación (%); 2) fase de multiplicación: los ápices de plántulas de siete semanas de edad, provenientes del establecimiento, con diferentes concentraciones (0,5 mg L⁻¹; 0,75 mg L⁻¹; 1 mg L⁻¹) de N-6 Bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (KIN), a partir de las cuales se evaluó el número de brotes, longitud de brotes (cm) y diámetro de brotes (mm); y 3) fase de enraizamiento: los explantes de plántulas provenientes de la multiplicación, fueron sometidos a diferentes niveles (0,5 mg L⁻¹; 0,75 mg L⁻¹; 1 mg L⁻¹) de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (IAA), se evaluó la presencia de raíces, número de raíces y longitud de raíces. En la fase de establecimiento el porcentaje de contaminación fue del 0% y las semillas germinaron a los 15 días después de la siembra (dds) (*C. sinensis*), 17 dds (*C. reticulata*) y 20 dds (*C. aurantiifolia*). En la multiplicación, la respuesta de los explantes a la dosis de 0,50 mg L⁻¹ BAP fue la que mejores resultados presentó con 3 brotes. En la fase de enraizamiento, con la dosis de 0,75mg L⁻¹ de ANA se observó mayor eficiencia en cuanto al número de raíces fue (3 raíces). Los resultados demuestran que el uso de fitorreguladores en la propagación *in vitro* puede potencializar y mejorar la producción de plantas del género *Citrus* a nivel comercial.

Palabras clave: *Protocolo, reguladores de crecimiento, cítricos.*

ABSTRACT

The *Citrus* genus is cultivated in more than 140 countries, mainly in tropical and subtropical areas, representing one of the most important fruit crops, in terms of economic value and human nutrition. *In vitro* tissue culture is a tool that allows the reliable propagation of large volumes of plants in less time. The objective of the research was to evaluate the effect of growth regulators on the *in vitro* propagation of three *Citrus* species (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantiifolia*). A Completely Random Design (DCA) was established in factorial arrangement (AxBxC)+1, applying Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$) for the means of the treatments. The micropropagation was carried out in three phases: 1) establishment phase: the seeds of each species were placed in Murashige and Skoog (MS) culture medium and the days to germination and contamination (%) were evaluated; 2) multiplication phase: the apices of seven-week-old seedlings, from the establishment, with different concentrations (0.5 mg L⁻¹; 0.75 mg L⁻¹; 1 mg L⁻¹) of N-6 Benzylaminopurine (BAP) and Kinetin (KIN), from which the number of shoots, length of shoots (cm) and diameter of shoots (mm) were evaluated; and 3) rooting phase: the seedling explants from the multiplication were subjected to different levels (0.5 mg L⁻¹; 0.75 mg L⁻¹; 1 mg L⁻¹) of naphthaleneacetic acid (ANA) and indoleacetic acid (IAA), the presence of roots, number of roots and length of roots were evaluated. In the establishment phase the percentage of contamination was 0% and the seeds germinated 15 days after sowing (*C. sinensis*), 17 dds (*C. reticulata*) and 20 dds (*C. aurantiifolia*). In multiplication, the response of the explants to the dose of 0.50 mg L⁻¹ BAP was the one with the best results with 3 shoots. In the rooting phase, with the dose of 0.75mg L⁻¹ of ANA, a higher efficiency was observed in terms of the number of roots (3 roots). The results show that the use of phytohormones in *in vitro* propagation can potentiate and improve the production of plants of the genus *Citrus* at a commercial level.

Keywords: *Protocol, growth regulators, citrus.*

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son frutales pertenecientes a la familia Rutaceae, ampliamente distribuidos y consumidos en el mundo. El género *Citrus* se cultiva en más de 140 países, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, y representa uno de los cultivos frutales más importantes, en términos de valor económico y nutrición humana (Liu et al., 2012). La producción mundial anual de cítricos ha sido testigo de un fuerte y rápido crecimiento en las últimas décadas, desde aproximadamente 30 millones de toneladas métricas a fines de la década de 1960 (FAO, 1967), hasta una estimación total de más de 157 millones de toneladas métricas en el 2019 siendo los mayores productores, China 27%, Brasil 12%, India 9%, México 6%, Estados Unidos 5% y España 4% (FAOSTAT, 2019).

En Ecuador, la citricultura se ha desarrollado en las últimas décadas con el objetivo de exportación y el consumo local en fresco de la fruta. El Instituto Nacional de Encuestas y Censos, INEC (2018) estimó que existe un área cultivada de 39,964 ha, y una producción de 146,765 t ha⁻¹, siendo Bolívar (32%), Manabí (31%), Los Ríos (15%), Guayas (4%) y EL Oro (3%) las principales provincias productoras; siendo Manabí la segunda provincia productora de cítricos con una producción de 45,871 t ha⁻¹, y una extensión de 12,061 hectáreas sembradas.

La producción de cítricos durante las últimas décadas se destaca entre los cultivos frutales, por el desarrollo en la industria, el comercio internacional y el constantemente consumo de los frutos y de sus productos derivados; caracterizados por el aroma distintivo y el delicioso sabor, los cítricos han sido reconocidos, como un alimento importante e integrado en la dieta diaria de la población, desempeñando papeles claves en el suministro de energía, nutrientes y aportando a la salud; presenta bajo contenido de proteínas y muy poco contenido de grasa, suministran principalmente carbohidratos, como sacarosa, glucosa y fructosa (Liu et al., 2012).

Los cítricos tradicionalmente se propagan vegetal y sexualmente. Los principales métodos de propagación vegetativa son la división, la obtención de estacas o esquejes, el acodo y el injerto. La reproducción asexual, consiste en la propagación empleando partes de la planta original y esto es posible debido a que cada célula de la planta contiene la información genética necesaria para generar una planta nueva, esta característica se conoce como totipotencia celular. La producción de un nuevo

organismo es a partir de un fragmento del propio organismo, que pueden ser porciones de hojas y/tallos (Vega, 1997).

El injerto constituye el arte de juntar partes de plantas, que se sueldan y en un arreglo vertical continúen su crecimiento como una sola planta, esta técnica es muy antigua y ya era practicada por los horticultores chinos desde tiempos remotos (Castro, 2005).

La propagación sexual, se basa en la selección de brotes y de portainjertos, los mismos que se obtienen por semillas que son apomícticas (poliembriónicas). No obstante, el uso de métodos tradicionales y la reproducción a través de semillas presenta una serie de inconvenientes como el prolongado período juvenil, pérdida de vigorosidad, alta heterocigosidad, siendo el principal problema el periodo de latencia de su semilla en la producción intensiva, que suele oscilar hasta los 30 días y limita los programas de multiplicación (Ancillo & Medina, 2015). Es por esto por lo que la disponibilidad de diversos procedimientos biotecnológicos ha abierto nuevas vías, para la solución de una parte importante de los problemas existentes, ya que permiten superar algunas limitaciones de los métodos tradicionales y ofrecen nuevas estrategias de trabajo (Bisang et al., 2009).

Por ello, se han implementado alternativas como el cultivo *in vitro* de tejidos, para la propagación de esta especie, esta herramienta permite la propagación fiable de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos (Amoo et al., 2012). En los últimos años, las técnicas de micropropagación se han utilizado ampliamente para varias especies de plantas. En cítricos el medio desarrollado por Murashige y Skoog en 1962, es el más usado y al que más cultivos se adaptan, su concentración de sales minerales y nutrientes proporcionan un medio óptimo para el desarrollo de meristemas axilares (Gella & Errea, 1998).

Para el caso de los cítricos, la regeneración de plantas *in vitro* sea por vía embriogénesis somática u organogénesis, generalmente resulta exigente en cuanto a la composición del medio, especialmente en lo referente a los reguladores del crecimiento (Bisang et al., 2009).

La micropropagación se divide en cinco fases que corresponden a la preparación del material vegetal, establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación,

enraizamiento y finalmente la adaptación a condiciones *ex vitro*. En las fases de multiplicación y enraizamiento las citoquininas y las auxinas juegan un papel importante (Azcon-Bieto & Talón, 2003).

Las citoquininas fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Aparte de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, las citoquininas también intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas entre otros procesos. En la micropropagación *in vitro* las citoquininas más utilizadas son la 6-Bencilaminopurina (BAP) y la kinetina (6-Furfurilaminopurina) (Cano & Carlos, 2004).

El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Las Auxinas pertenecen al grupo de hormonas vegetales; son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Las auxinas estimulan la elongación o alargamiento de ciertas células e inhiben el crecimiento de otras, en función de la cantidad y su distribución en el tejido vegetal (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

En la última década, con el desarrollo de protocolos de micropropagación, los trabajos de cultivo de tejidos en cítricos han tenido grandes avances. El cultivo de tejidos es una importante herramienta que constituye una alternativa para la multiplicación de los cítricos, pues presenta gran potencialidad y estrategias para estudios de fenómenos citológicos, morfológicos y fisiológicos. Además, nos permite acortar el tiempo de crecimiento para la producción masiva de plantas uniformes (Moura et al., 2001).

En este orden de ideas, la finalidad del presente trabajo es evaluar la respuesta de tres especies de *Citrus* (naranja criolla, mandarina criolla y limón sutil), frente a dos fitorreguladores del crecimiento en cultivo *in vitro*, con el propósito de aportar a futuros trabajos de investigación.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de fitorreguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de tres especies de *Citrus*.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de tres especies de *Citrus*.

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de citocininas en la multiplicación *in vitro* de los explantes.

- Identificar la dosis óptima de auxinas para el enraizamiento de explantes provenientes de la micropropagación.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Origen y distribución

El origen de los cítricos se identifica con una historia llena de controversia y leyendas interesantes. Investigadores mencionan que el origen del género *Citrus* se produjo hace aproximadamente 20 millones de años en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indo Malayo hasta Nueva Guinea (Peryeda-Hernández, et al., 2014). Otros mencionan que el género *Citrus* se originó especialmente en las vertientes de la cordillera del Himalaya, en el noreste de India, Myanmar y suroeste de China; mostrando relaciones filogenéticas, cuyas distribuciones se extienden hasta las indias orientales, Australia, China central, Japón e incluso África (Cleves-Leguízamo & Jarma-Orozco, 2014).

Liu et al. (2012) indican que, mientras algunas especies comerciales como naranjas, mandarinas y limones originalmente procedían del sudeste de Asia, los verdaderos orígenes de los cítricos son Australia, Nueva Caledonia (frente a la parte oriental de Australia) y Nueva Guinea.

El conocimiento sobre la utilización de sus frutos, así como el cultivo de los árboles, se extendió desde China e India pasando a través de Persia y Palestina, hasta conocerse en África del Norte y Europa, en las áreas adyacentes a la cuenca del Mediterráneo (Palacios, 1978). Es con el esplendor de las civilizaciones china e hindú cuando el cultivo inicia su propagación hacia el sur de Japón, el archipiélago de Malasia y todos los países del sureste asiático (Morín, 1985). Las primeras plantaciones comerciales para el consumo en fresco datan de finales del siglo XVIII y se han ido ampliando hasta alcanzar en la actualidad una extensa superficie destinada a su cultivo. Esto ha permitido desarrollar unas técnicas y una cultura específica, basada en la óptima adaptación de este cultivo al entorno agroclimático (Zaragoza, 1993).

3.2. Clasificación botánica

Los cítricos pertenecen al reino Plantaea, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Sapindales, familia Rutacea, subfamilia Aurantioideae y al género *Citrus*. Siendo las especies del género *Citrus* las más importantes desde el

punto de vista agronómico. Dentro de ellos se conocen las siguientes especies: naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), mandarina (*Citrus reticulata* (Blanco)), limón (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) y toronja (*Citrus paradisi* (Macfad.)). De todas las especies de cítricos la naranja es la fruta más común y la más conocida en el ámbito mundial (Cleves-Leguízamo et al., 2012).

3.3. Descripción morfológica

Los cítricos son árboles o arbustos pequeños, dotados con numerosas ramas delgadas y con espinas, sus frutos son de forma esférica u oval con base convexa y en ocasiones con cuello pequeño: gradualmente van tornándose de verde claro a amarillo, o cuando comienza la maduración (Pereyda-Hernández et al., 2014). Generalmente se encuentran en regiones subtropicales, presentan adaptabilidad a las condiciones ambientales de zonas tropicales, sin embargo, al aumentar la temperatura, el color de la cáscara, así como la calidad interna de la fruta se torna diferente a las plantaciones establecidas en zonas subtropicales (Cleves Leguízamo et al., 2012).

3.3.1. *Citrus sinensis* L.

La naranja es una variedad de copa redonda y vigorosa, de hojas grandes; con tendencia a floraciones fragantes, muy abundantes (González et al. 1998), de color blanco; su tronco no presenta espinas o con muy pocas. Con hojas de forma lanceolada, de color verde oscuro, brillante, y fragantes al estrujarlas. Su fruto es de gran tamaño, muy precoz, de color anaranjado, corteza ligeramente rugosa y fácil de pelar, pulpa de color naranja intenso, sabor dulce, pero es supernumerario, es decir, pequeños frutos que aparecen dentro del fruto principal por una aberración genética (Aznar, 1999).

3.3.2. *Citrus reticulata* Blanco

La mandarina es un árbol pequeño de 2-6 m de altura, tronco con frecuencia torcido, generalmente sin espinas. Ramillas angulosas. Hojas oblongo-ovales, elípticas o lanceoladas, de 3.5-8 cm y 1.5-4 cm de anchura, con la base y el ápice obtusos. Margen aserrado por encima de la base. Son de color verde oscuro brillante en el haz y verde amarillento en el envés, fragantes cuando se las tritura. Pecíolos con ala muy corta. Inflorescencias axilares o terminales con 1-4 flores pentámeras, de color blanco, olorosas, de 1.5-2.5 cm de diámetro. 18-23 estambres, casi libres (Vanegas, 2002).

Frutos de 4-7 cm de longitud y 5-8 cm de diámetro, globoso-deprimidos. Su color varía de amarillo verdoso a naranja y rojo anaranjado. La superficie es brillante y está llena de glándulas oleosas hundidas. La cáscara es delgada, muy fragante, separándose fácilmente de la pulpa. Pulpa jugosa y dulce, refrescante. Semillas oblongo-ovoides (Vanegas, 2002).

3.3.3. *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

La variedad sutil es un árbol chico o arbusto de 4 a 5 m de altura con tronco a menudo torcido y ramas con espinas axilares cortas y duras. Hojas oblongo-avales o elípticas-ovales de 2,5 a 9 cm de longitud y de 1,5 a 5,5 cm de ancho. Base redondeada y ápice ligeramente recortado. Márgenes ligeramente crenulados. Peciolos notablemente a los lados. Flores blancas de 1,5 a 2,5 cm de diámetro, fragantes, que se ubica en una inflorescencia axilar de 1 a 7 flores (Vanegas, 2002).

3.4. Importancia económica y nutricional de los cítricos

Los cítricos son cultivos de gran importancia comercial en las regiones tropicales y subtropicales; ya que se consumen al natural o se procesan para hacer jugos, jaleas, mermeladas, conservas y otros tipos de caramelos. La extracción de aceites esenciales y subproductos de los cítricos para procesos industriales, como la pulpa pellets, generando grandes ingresos a medianos y grandes productores citrícolas (Krueger & Navarro, 2007). La producción de naranjas, mandarinas, limones y limas ha aumentado rápidamente, y aún más los productos cítricos elaborados, gracias a las mejoras introducidas en el transporte y en el empaquetado que han reducido los costos y mejorado la calidad (FAO, 2010).

La importancia nutricional de los cítricos se basa en su alto contenido de antioxidantes, que son sustancias capaces de bloquear la acción negativa de los radicales libres; además, ayudan a evitar el envejecimiento prematuro del organismo y prevenir enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer (Valarezo et al., 2014).

La fruta de los diferentes cítricos es muy demandada a nivel mundial por poseer vitaminas A y C, ácido fólico y minerales como el potasio, el magnesio y calcio; fibra (Rincón et al., 2005). Principalmente se destaca la vitamina C, la cual no es

almacenada por el cuerpo, por lo que es necesario obtenerla a través del consumo diario de este tipo de frutas. Además, esta vitamina favorece la regeneración de los tejidos, promueve la cicatrización, fortalece a los vasos sanguíneos y mantiene huesos, encías y dientes sanos. Es una excelente aliada del sistema respiratorio, porque aumenta sus defensas, alivia las molestias del resfriado, gripes y dolor de garganta; además tiene acción antiviral y antibacteriana. La fibra es otro nutriente presente en los cítricos; contribuye en la limpieza del tracto digestivo, desecha grasas y toxinas (Valarezo et al., 2014).

3.5. Propagación de los cítricos

Los cítricos pueden propagarse sexual o asexualmente. La reproducción sexual o por semilla permite obtener plantas rústicas, vigorosas y de larga vida, pero da lugar a una variabilidad en las decencias, lo cual afecta el valor comercial de las cosechas; aunque el cítrico se distingue de las demás especies frutales porque una semilla da lugar a más de un embrión (poliembriónaria), fenómeno que permite obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre. No obstante, la reproducción a través de semillas presenta una serie de inconvenientes tales como: plantas que tienen que pasar un período juvenil, que además no son vigorosas y que presentan heterogeneidad; por ello, esta técnica, sólo es común emplearla para la obtención de portainjertos (Rojas, 2001).

La multiplicación asexual o vegetativa (acodo, estaca, injerto) permite obtener plantas que reproducen las características de la planta madre, aceleran el proceso de multiplicación y mejora la calidad de la fruta; pero las plantas obtenidas vegetativamente tienen menos robustez y longevidad (Amórtegui, 2001).

3.6. Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeños de ellas, como son los tejidos o células, cultivadas asépticamente en recipientes de vidrio en donde se pueden controlar estrictamente las condiciones ambientales, sanitarias y de nutrición. (González et al., 1998).

3.7. Micropropagación

La micropropagación es un conjunto de técnicas, que consiste en la multiplicación de platas a partir de microestacas de 1 cm de longitud, en condiciones controladas de laboratorio, esta técnica ha sido utilizada con éxito desde los años 60. La principal ventaja de esta técnica estriba en la multiplicación rápida de material clonal libre de enfermedades. Esta característica ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejora o manipulación genética (Holdgate & Zandvoort, 1992; Escobar et al., 2012).

3.8. Importancia de la micropropagación

Las técnicas de propagación *in vitro* han resultado de gran utilidad para la solución de problemas fitosanitarios, ya que permiten una rápida multiplicación de material libre de plagas y enfermedades. El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Escobar et al., 2012).

3.9. Germinación *in vitro* de semillas de cítricos

Las semillas germinadas *in vitro* son comúnmente usadas como fuente de explantes. Las semillas son típicamente preparadas removiendo la testa o cubierta seminal, desinfectada normalmente con cloro y sembradas *in vitro* en un medio básico. Lo ideal, es lograr que la semilla pueda emerger rápida y uniformemente. Sin embargo, las semillas muestran una germinación lenta y no uniforme, resultando en el alargamiento del tiempo para obtener poblaciones de plántulas las cuales son de varios tamaños y etapas fisiológicas. Por tanto, la reducción de la variabilidad de los factores que afectan cada paso del proceso de germinación es realmente importante para generar y lograr resultados consistentes (Niedz, 2008).

3.10. Etapas de la micropropagación

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4)

aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (Levitus, 2010; George et al., 2008).

3.10.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explante, incide directamente sobre la respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo *in vitro*, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Levitus, 2010; George et al., 2008).

3.10.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Levitus, 2010).

Una vez seleccionadas las plantas (aquellas que posean unas características fenotípicas deseadas) se requiere desinfectar superficialmente el material escogido para evitar que en el medio de cultivo crezcan microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán con el explante, la selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan inicialmente por las características del explante (Núñez & Mariño, 2008).

3.10.3. Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es inducir la multiplicación de los explantes mediante la formación de nuevas estructuras a través de la vía elegida (axilar o adventicia, embriogénica, etc.). En esta fase se producen nuevos brotes o propágulos que cuando son separados del cultivo son capaces de formar una planta, pudiendo usarse como el inicio de otro ciclo de multiplicación con el fin de aumentar su número (Levitus, 2010).

3.10.4. Etapa 3: Enraizamiento

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más

complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis (Levitus, 2010).

3.10.5. Etapa 4: Aclimatación

La manera en la que se transfiere las plantas desde el ambiente *in vitro* a condiciones *ex vitro* condiciona enormemente el éxito del proceso completo de la micropropagación (Castillo, 2013).

Las plantas cultivadas en condiciones *in vitro* poseen habitualmente estomas no funcionales y cutículas poco desarrolladas debido a la alta humedad relativa en el interior del frasco de cultivo y a la escasa realización de la fotosíntesis. Bajo las condiciones de cultivo *in vitro* los explantes son mixotróficos, casi no fotosintetizan y su necesidad de carbono orgánico lo suplen con los azúcares añadidos al medio; el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por tanto, antes de transferirlas a las condiciones externas deben sufrir un proceso de acondicionamiento gradual: protección a la luz y control de la transpiración estomática y cuticular (Núñez & Mariño, 2008).

Es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales convienen que estén debidamente desinfectados (Levitus, 2010).

3.11. Medio de cultivo

Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Así, los medios de cultivo pueden ser líquidos o tener un soporte sólido, tienen sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, fitohormonas (Pullas, 2011)

Los componentes del medio de cultivo se dividen en minerales y orgánicos. Los primeros a su vez se dividen en macroelementos como el carbono, oxígeno, hidrógeno,

nitrógeno fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio, y los oligoelementos o microelementos que, aunque son necesarios en menor cantidad, juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales microelementos son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cobalto y boro (González, et al., 1998).

El éxito del cultivo de tejidos de plantas depende en gran medida del medio nutriente adecuado. El medio Murashige-Skoog (1962) reúne los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales y ha sido ampliamente utilizado en la preparación de mezclas comerciales, comúnmente se emplea como medio basal el medio MS completo suplementado con 3% de sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas (Rodríguez et al., 2004).

3.12. Fitorreguladores de crecimiento

Las hormonas vegetales (fitohormonas) son un conjunto de sustancias orgánicas sintetizadas en pequeñas cantidades en una parte de la planta y trasladada a otra parte de la planta, en donde influyen en procesos fisiológicos específicos, tales como crecimiento, diferenciación y desarrollo entre otros. Controlan actividades de la expresión genética y son reguladas genéticamente, por otra parte; un fitorregulador de crecimiento es un compuesto que aplicado exógenamente en pequeñas cantidades debe ejercer los mismos efectos biológicos (Stoller, 2008).

Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico, todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta.

3.12.1. Auxinas

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA; Ludwig-Müller & Cohen, 2002). Aunque las auxinas se encuentran en todos los tejidos de la planta, una mayor concentración ocurre

en las regiones que están en crecimiento activo. El transporte de auxinas es complejo y está regulado por la acción de varias proteínas. IAA se sintetiza principalmente en el ápice de las yemas, y se transporta polarmente hacia la raíz a través de células parenquimáticas asociadas al tejido vascular (Went & Thimann, 1937).

Debido a que las auxinas influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas (Jenik & Barton, 2005). Mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleoptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias. Tras el descubrimiento de la estructura del IAA, se han obtenido compuestos químicos estimulantes del crecimiento basados en auxinas naturales.

En un principio se analizaron otros compuestos con anillo indólico, como el ácido indol butírico (IBA) y derivados del naftaleno como el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido naftoxi-2-acético (NOA), que también resultaron activos. IBA fue clasificado inicialmente como una auxina sintética, pero es un compuesto endógeno de la planta, más eficiente que IAA en promover formación de raíces laterales y es usado comercialmente con este propósito.

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento, entre otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (Pierik, 1990).

3.12.2. Citoquininas

Las citocininas son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes. El reconocimiento que las citocininas pudiesen corresponder a hormonas vegetales se inició con el descubrimiento de la kinetina en la época de los 50, siendo este un artefacto producto de la degradación del ADN en espermátidas de arenque sometidas al autoclavado (temperatura y presión). Las citocininas causan una

dominancia apical reducida o anulada, con brotación y crecimiento de yemas axilares. Pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y pecíolos intactos (Howell et al., 2003).

Las citoquininas se asocian con los procesos de división celular. La producida artificialmente tiene propiedades análogas a las naturales. La zeatina es una citoquinina natural extraída de la semilla de maíz, pero está a un costo muy alto (Pierik, 1990).

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además, se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Pierik, 1990).

3.12.3 Ácido giberélico

El Ácido giberélico (GA₃) fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta. La síntesis de GAs ocurre en varios lugares, sin considerar la situación específica en semillas de cereales. En plántulas, la síntesis y presencia de altos contenidos de estas hormonas se detecta en hojas y yemas en activo crecimiento y en material adulto a nivel de frutos, y en menor medida en raíces. El efecto más notable de las GAs es inducir crecimiento en altura, en muchos casos atribuibles a GA1 endógena. Además, inducen la germinación en semillas en condiciones de dormancia (Jordán, 2006).

En la tecnología conducente a la regeneración de plantas *in vitro*, el cultivo de meristemas es una metodología ampliamente utilizada con el objeto de eliminar una serie de patógenos presentes en las plantas madre. El rol de GAs es una técnica doble: primero los tejidos meristemáticos extraídos (explantes o ápices caulinares de mayor tamaño) requieren de GAs para poder crecer en esta primera fase, aunque ello requiere además de otras hormonas. En segundo lugar, es posible realizar un tratamiento previo con GAs a plantas madre con objeto de estimular previamente su crecimiento el cual, en condiciones de altas temperaturas y humedad, favorece la extracción de ápices igualmente libres de los patógenos (Jordán, 2006).

3.12.4. Ácido Abscísico

Las sustancias responsables de la caída de las hojas y frutos se llaman ácido abscísico: inhibe el crecimiento celular y la fotosíntesis, es un inhibidor de crecimiento natural presente en plantas. La síntesis tiene lugar en las yemas que es estructuralmente muy similar a la porción terminal de los carotenoides (Howell et al., 2003).

Juega un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y estrés hídrico, y por lo tanto tiene efectos contrarios a las de las hormonas del crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas). El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de las plantas, sin embargo, las concentraciones elevadas parecen estar localizadas en semillas, frutos jóvenes y en la base del ovario (Stoller, 2008).

3.12.5. Etileno

Según Stoller (2008) el etileno, siendo un hidrocarburo no saturado, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, dormancia, floración y otras respuestas. El etileno parece ser producido esencialmente por las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejidos específicos y su estado de crecimiento y desarrollo. Las funciones del etileno se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Promueve la maduración de los frutos.
2. Promueve la maduración de los frutos.
3. Caída de hojas.
4. Geotropismo en las raíces.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del ensayo

Las actividades de investigación fueron desarrolladas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, durante los meses de septiembre del 2019 a febrero del 2020. El laboratorio se localiza en la parroquia Lodana km 12,5 vía Portoviejo-Santa Ana, Provincia de Manabí, Ecuador ubicado geográficamente a 01° 09' de latitud sur y 80° 21' de longitud oeste a una altitud de 47msnm.

4.2. Material vegetal

Las especies motivo de estudio fueron: naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), mandarina (*Citrus reticulata* (Blanco), limón (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), por la relevancia económica significativa en el cantón Santa Ana, además de ser muy comercializadas y apreciadas en el mercado en la provincia de Manabí. El material vegetal fue colectado en una de las fincas consideradas como una de las más productivas de la parroquia Ayacucho (sitio San Bartolo) del cantón Santa Ana. Dentro de los criterios para la selección del material vegetal se eligieron arboles fenotípicamente sanos y frutos de cítricos fisiológicamente maduros.

4.3. Metodología

Las actividades de esta investigación se desarrollaron en las siguientes fases:

4.3.1. Fase I. Selección y desinfección de semilla para el establecimiento *in vitro* de tres especies de *Citrus*.

El proceso se inició con la selección de árboles que cumplieran con el criterio de selección. Las semillas utilizadas se obtuvieron de frutos de cítricos completamente maduros (Figura 1. A - B). Una vez seleccionados los frutos, fueron sometidos a un proceso de desinfección (Figura 1. C), que consistió en lavados con agua destilada y jabón líquido, posteriormente fueron llevados a condiciones de cámara para realizar el flameado del fruto, dicho proceso se realizó 3 veces por cada fruto, para posteriormente extraer 40 semillas por cada material (Figura 1. D - E), las mismas que se lavaron tres veces con agua estéril, se retiró la testa para favorecer la germinación

de las semillas a (Figura1. F) en concordancia con lo descrito por (Almeida et al., 2002).

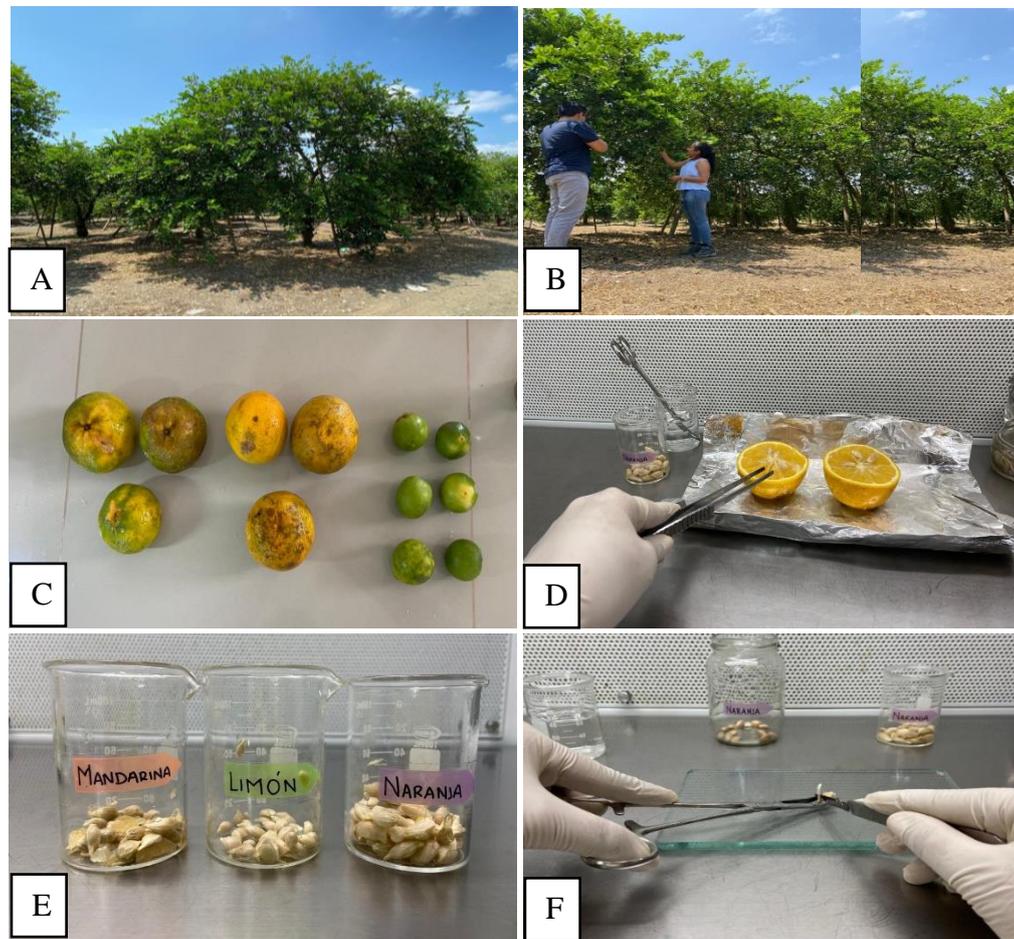


Figura 1. A) Selección de árboles de cítricos. B) Colecta de fruto de cítricos. C) Desinfección de frutos. D) Remoción de semillas. E) Semillas extraídas de cada variedad F) Remoción de testa de semillas.

4.3.1.1 Establecimiento *in vitro* de semillas de tres especies de *Citrus*.

Previo al establecimiento de las semillas, el medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5,7 y esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las semillas fueron colocadas en tubos de ensayos conteniendo medio de cultivo basal de la formulación de Murashige y Skoog (MS) (1962). (Figura 2. A), y colocadas en condiciones de cultivo a 24 ± 2 °C y un fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas luz.

Para el establecimiento de material *in vitro* de tres especies de *Citrus* se utilizaron 40 semillas de cada especie, las mismas que fueron colocadas en tubos de ensayo con el medio de Murashige y Skoog (1962). (Figura 2. B - C). Se flameó la

boca del tubo antes de sembrar y se selló con papel films, posteriormente los cultivos, fueron colocados en cámara de crecimiento por nueve semanas.

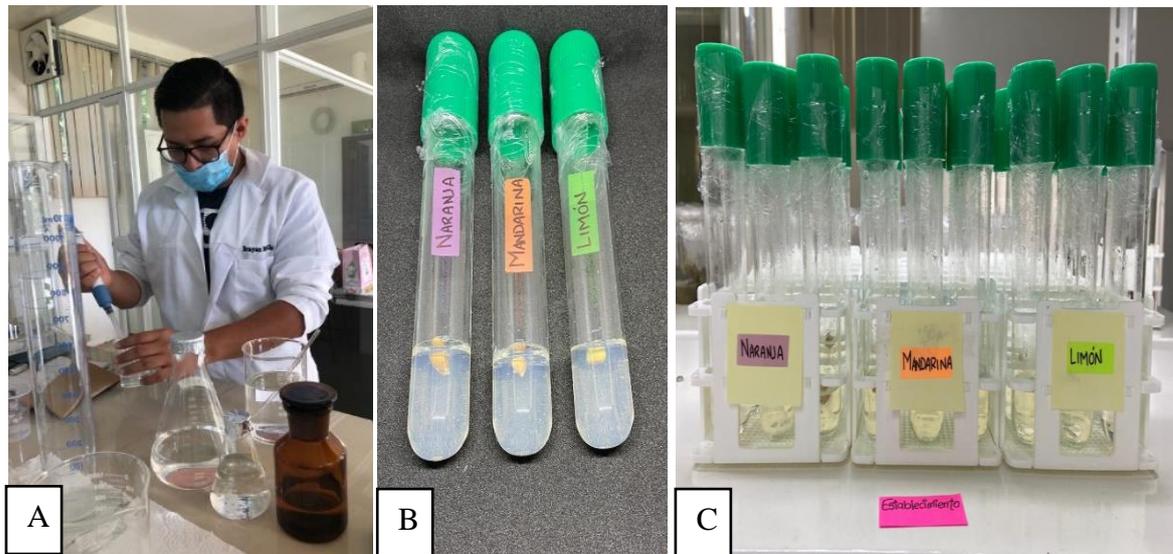


Figura 2. A) Preparación de medios MS. B) Semillas establecidas en medio MS C) Semillas coladas en cámara de crecimiento. Variables de establecimiento *in vitro*

Días a la germinación (Días)

Se registró el número de días transcurridos para la germinación, después de la siembra de las semillas en tubos de ensayo por cada material en estudio.

Contaminación (%)

Se evaluó el porcentaje de semillas contaminadas por bacterias y hongos, las evaluaciones se realizarán diariamente durante 10 días, después de la siembra de las semillas por cada material.

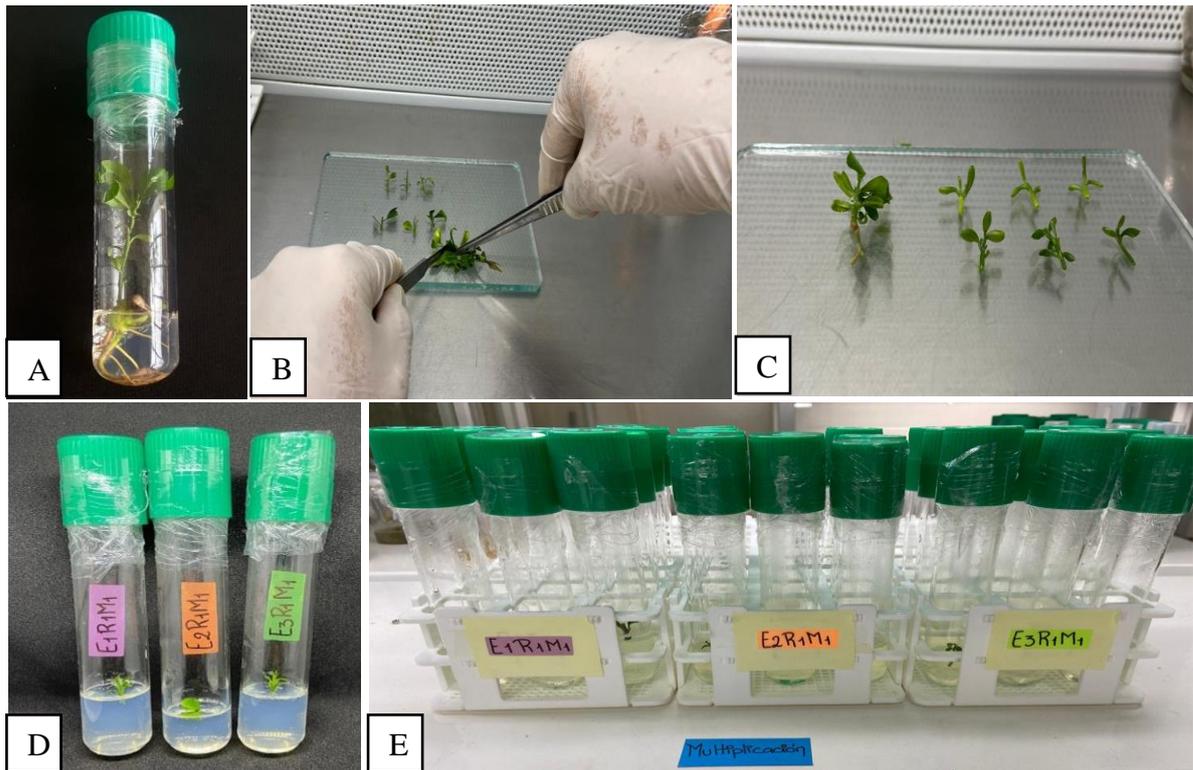
4.3.2. Fase II: Multiplicación *in vitro*

Procedimiento para la multiplicación *in vitro* de tres especies de *Citrus*

Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de BAP (N-6 Bencilaminopurina) y KIN (Kinetina) en la multiplicación *in vitro* de 3 especies de *Citrus*, se emplearon ápices de plántulas de siete semanas de edad, después de la germinación (Figura 4. A), obtenidas de semillas germinadas *in vitro*. Y se empleó la metodología descrita por (Hernández-Jerez et al., 2013), con modificaciones.

En condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar) se realizó el corte de los ápices de 1cm de longitud aproximadamente, (Figura 3. B - C) los mismos que fueron cultivados en tubos de ensayos con 10 ml de medio de cultivo (MS) suplementado con diferentes concentraciones de BAP, KIN, sacarosa al 3%, Agar Plant TC al 0,7% y un pH de 5,7 + 0,02 (Tabla 1, Figura 3. D y E). El medio de cultivo fue previamente esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión por 20 minutos.

Figura 3. A) Plántula de siete semanas para toma de ápices. B) Extracción de ápices. C)



Ápices de 3 especies de cítricos D) Establecimiento de ápices de 3 especies de cítricos. E) Tratamientos en cámara de crecimiento.

Variables de multiplicación *in vitro*

Número de brotes

A las ocho semanas posteriores a la siembra, se contabilizó el número de brotes emitidos por explantes en cada tratamiento y repetición

Longitud de brotes (cm)

Se midió la longitud de 5 brotes por tratamiento y repetición, se realizó la evaluación a las ocho semanas después de la siembra (SDS). Esta variable se evaluó con un calibrador y en condiciones asépticas

Diámetro de brotes (mm)

A las ocho semanas posteriores de la siembra, se registró el diámetro de brotes de cinco tubos por tratamiento y repetición.

4.3.3. Fase III: Enraizamiento *in vitro*

Procedimiento para el enraizamiento *in vitro* de tres especies de *Citrus*.

Para inducir el enraizamiento se utilizaron catorce tratamientos con diferentes niveles de auxinas incluyendo por cada material un tratamiento libre de reguladores de crecimiento (Figura 4. A). Los explantes utilizados provienen de plántulas obtenidas de la multiplicación (Figura 4. B), los mismos que fueron cultivados en vasos plásticos con tapas, conteniendo 30 ml de medio de cultivo y 1 explante/vaso (Figura 4. C-D-E), los cultivos fueron mantenidos en condiciones de 24 + 2°C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad durante 30 días (Figura 4. F).

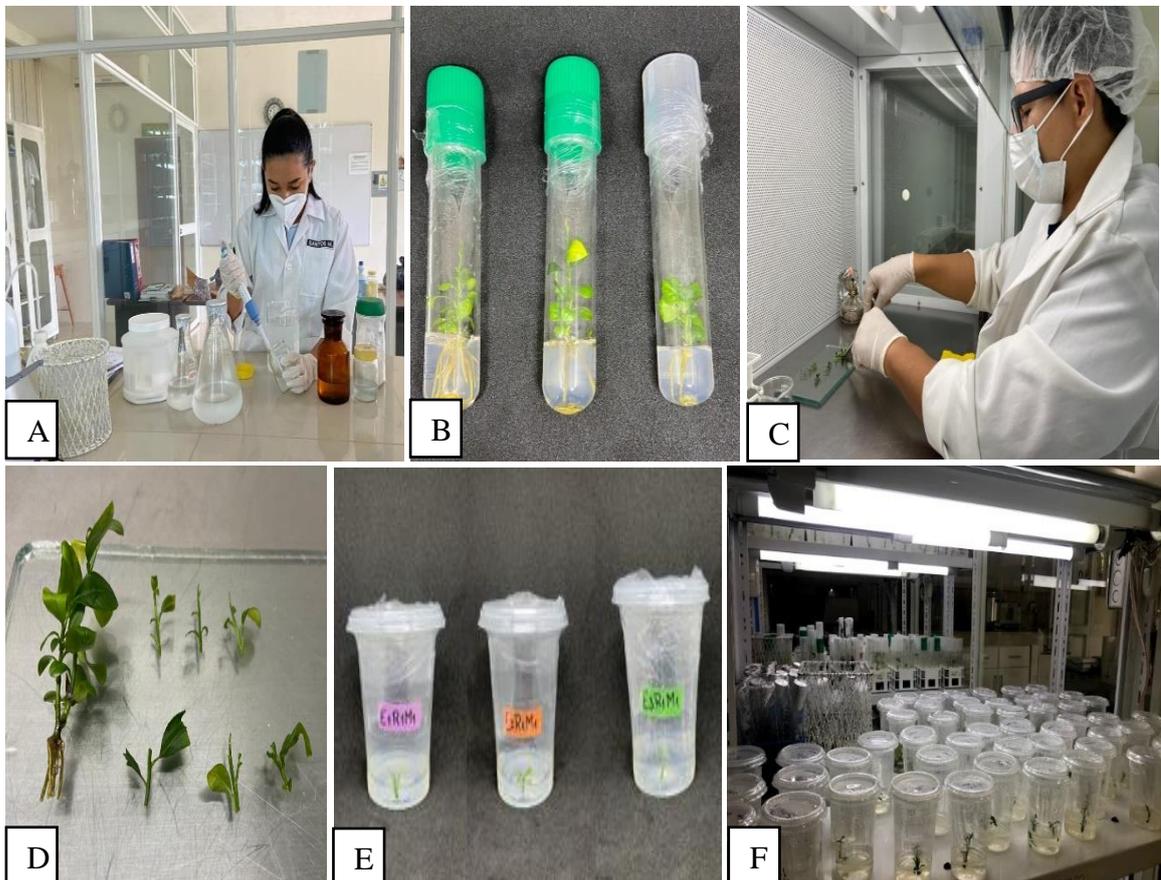


Figura 4. A) Preparación de medio MS suplementado con diferentes fitorreguladores B) Plántulas de la fase de multiplicación. C) Extracción de ápice. D) Ápices utilizados para el enraizamiento. E) Establecimiento de ápices para el enraizamiento. F) Tratamientos establecidos en cámara de crecimiento.

Variables para enraizamiento

Presencia de raíces

Se registró la presencia de raíces cada siete días, en cada uno de los tratamientos en estudio a partir de la cuarta semana.

Numero de raíces

Se evaluó el número de raíces presentes en cada una de las especies y tratamientos a los 60 días después de la inducción.

Longitud de raíces (cm)

A los 60 días de cultivo se midió la longitud de las raíces presentes en cada tratamiento, con la ayuda de un calibrador.

Tabla 1. Factores en estudio para fases de multiplicación y enraizamiento

Factores en estudio para multiplicación	Factores en estudio para enraizamiento
Factor A: Especies	Factor A: Especies
E1: Variedad naranja criolla E2: Variedad mandarina criolla E3: Variedad limón sutil	E1: Variedad naranja criolla E2: Variedad mandarina criolla
Factor B: Fitorregulador	Factor B: Fitorregulador
F1: BAP F2: KIN	F1: ANA F2: AIA
Factor C: Dosis	Factor C: Dosis
D1: 0,50 mgL ⁻¹ D2: 0,75 mgL ⁻¹ D3: 1 mgL ⁻¹	D1: 0,50 mgL ⁻¹ D2: 0,75 mgL ⁻¹ D3: 1 mgL ⁻¹

Tabla 2. Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de tres especies de cítricos.

FASE DE MULTIPLICACIÓN			
BAP (mgL⁻¹)	Variedad naranja criolla	Variedad mandarina criolla	Variedad limón sutil
0,50	T1= E1R1M1 (Naranja criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ BAP)	T8=E2R1M1 (Mandarina criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ BAP)	T15= E3R1M1(Limón sutil + MS + 0,50 mgL ⁻¹ BAP)
0,75	T2= E1R1M2(Naranja criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ BAP)	T9= E2R1M2(Mandarina criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ BAP)	T16= E3R1M2(Limón sutil + MS + 0,75 mgL ⁻¹ BAP)
1	T3= E1R1M3(Naranja criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ BAP)	T10=E2R1M3 (Mandarina criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ BAP)	T17= E3R1M3(Limón sutil + MS + 1 mgL ⁻¹ BAP)
KIN (mgL⁻¹)			
0,50	T4= E1R2M4 (Naranja criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ KIN)	T11=E2R2M4 (Mandarina criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ KIN)	T18= E3R2M4 (Limón sutil + MS + 0,50 mgL ⁻¹ KIN)
0,75	T5 =E1R2M5(Naranja criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ KIN)	T12=E2R2M5 (Mandarina criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ KIN)	T19= E3R2M5 (Limón sutil + MS + 0,75 mgL ⁻¹ KIN)
1	T6=E1R2M6(Naranja criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ KIN)	T13=E2R2M6 (Mandarina criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ KIN)	T20= E3R2M6 (Limón sutil + MS + 1 mgL ⁻¹ KIN)
TESTIGO			
	T7 =E1R0M7(Naranja criolla + MS)	T14=E2R0M7(Mandarina criolla + MS)	T21= E3R0M7(Limón sutil + MS)

Tabla 3. Tratamientos para el enraizamiento *in vitro* de dos especies de cítricos.

FASE DE ENRAIZAMIENTO		
ANA (mgL⁻¹)	Variedad naranja criolla	Variedad mandarina criolla
0,50	T1= E1R1M1(Naranja criolla + MS 0,50 mgL ⁻¹ ANA)	T8= E2R1M1 (Mandarina criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ ANA)
0,75	T2= E1R1M2 (Naranja criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ ANA)	T9= E2R1M2(Mandarina criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ ANA)
1	T3= E1R1M3(Naranja criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ ANA)	T10= E2R1M3(Mandarina criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ ANA)
AIA (mgL⁻¹)		
0,50	T4= E1R2M4(Naranja criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ AIA)	T11= E2R2M4(Mandarina criolla + MS + 0,50 mgL ⁻¹ AIA)
0,75	T5= E1R2M5 (Naranja criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ AIA)	T12= E2R2M5(Mandarina criolla + MS + 0,75 mgL ⁻¹ AIA)
1	T6= E1R2M6(Naranja criolla + MS + 1 mgL ⁻¹ AIA)	T13= E2R2M6Mandarina criolla + MS +1 mgL ⁻¹ AIA)
TESTIGO		
	T7= E1R0M7 (Naranja criolla + MS)	T14=E2ROM7(Mandarina criolla + MS)

5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1. Análisis estadístico

En la fase de establecimiento se registraron los porcentajes de semillas germinadas y no contaminados (sanos). En las fases de multiplicación *in vitro* se estableció un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo factorial $A \times B \times C + 3$, (3 especies x dos inductores x 3 dosis + 3 testigos: uno/cada especie) el cual incluyó 21 tratamientos con tres repeticiones (Tabla 2), los mismos fueron analizadas a través de un análisis de varianza (ANOVA), aplicando la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,05$) para las medias entre los tratamientos. En la fase de enraizamiento *in vitro* se estableció un DCA, con arreglo factorial $A \times B \times C + 3$ (2 especies x dos inductores x 3 dosis + 2 testigo uno/cada especie), el cual incluyó 14 tratamientos con tres repeticiones (Tabla 3). Los datos obtenidos fueron analizadas a través de un análisis de varianza (ANOVA), aplicando la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,05$) para las medias entre los tratamientos El análisis se realizó con el paquete estadístico Infostat profesional 2018.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Establecimiento *in vitro*

Después de la siembra, se registró que las semillas de naranja, mandarina y limón germinaron a los 15, 17 y 20 días respectivamente (Tabla 4), así mismo el método de selección de frutos para obtener semillas y la desinfección de las semillas, funcionaron efectivamente para evitar la contaminación de los explantes en los tratamientos en estudio (Tabla 4), reportes que concuerdan con Beltrán et al. (2005), quienes obtuvieron una germinación de semillas de limón criollo a los 21 días. Por su parte Jesús et al. (2006), manifiestan que la diferencia que puede existir en el tiempo de germinación está dada por diferentes factores, por un lado, la especie y por otro lado la viabilidad como factor interno de las semillas para la germinación.

Ruchitha y Poojashree (2021), aseguran que la influencia de varios medios basales y reguladores de crecimiento vegetal ha sido eficiente en el establecimiento y micropropagación de explantes nodales de varias especies de *Cítricos*. Mientras que Scocchi et al. (2014), comentan que el uso de hormonas de crecimiento puede acortar la latencia de las semillas, ya que en ciertos casos esta latencia está asociada a inhibidores de crecimiento que estén presentes en la testa o en el endospermo de la semilla, lo cual, permite presumir que la germinación en naranja y mandarina pudo estar asociada a la viabilidad de la semilla y la ruptura de la latencia temprana. Cabe mencionar que, en el presente experimento, se removió la testa de cada semilla, lo que pudo favorecer la germinación de las especies en estudio de acuerdo con los resultados reportados por Almeida et al. (2002).

Tabla 4. Porcentaje de contaminación y días a la germinación de las semillas.

Cultivar	N.º Semillas	Contaminación %		Días a la germinación (Días)
		Bacterias	Hongos	
Naranja	40	0	0	15
Mandarina	40	0	0	17
Limón	40	0	0	20

Por otra parte, el proceso de desinfección de las semillas establecido permitió que no exista presencia de hongos ni bacterias, resultados que concuerdan con la investigación de Herrera & Rico (2005), quienes obtuvieron un 100% de efectividad en la desinfección de las semillas, con inmersiones en solución de Tween 20 al 0,3% por 5 minutos para luego ser sometidas con lavados en hipoclorito de sodio al 3%. Mientras que para Beura et al. (2003), la esterilización de la superficie es necesaria para que los explantes estén libres de todo tipo de contaminantes.

6.2. Multiplicación *in vitro*

En análisis de varianza realizado para la interacción especie x fitorregulador x dosis, mostró significancia estadística ($P \geq 0,05$) en la variable diámetro de brotes, mientras que para el número de brotes y longitud de brotes no se reportó significancia estadística (Tabla 5). Los mayores diámetros de brotes se obtuvieron con el tratamiento 10 (T10) que incluyó 1 mgL^{-1} de BAP en explantes de mandarina. Mientras que los menores diámetros se observaron en los tratamientos T15, T18 y T20, con 1,30 cm de brotes en los explantes de limón. En términos generales las combinaciones de BAP con explantes de mandarina presentaron los mejores diámetros de brotes (Tabla 5).

Los resultados de esta investigación se corresponden con los reportes de Taye et al. (2018), quienes estandarizando un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Citrus jambhiri* L., a partir de segmentos nodales y puntas de brotes, reportaron que con la adición al medio de cultivo de 0,5 y 1 mg/L de BAP se produjeron significativamente más brotes que con los tratamientos que incluían 1,5 y $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA. Mientras que Kour & Singh (2012), comprobaron que en *Citrus jambhiri* Lush., a partir de segmentos nodales el medio MS suplementado con BA ($1,5 \text{ mgL}^{-1}$) y extracto de malta 500 mgL^{-1} daba lugar al máximo número de brotes y longitud del brote en un tiempo mínimo durante la multiplicación *in vitro*.

Según Chamandoosti (2020), el efecto del BAP en comparación con otras citoquininas fue incomparable cuando se micropropagaron explantes nodales de *Citrus latifolia* en medio MS suplementado con $0,01 - 2 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP, obteniendo un mínimo de 2 un máximo de 8 brotes/explante. De la misma manera Moura et al. (2001), lograron

determinar que el comportamiento de la naranja frente a BAP es mejor comparado con otros cítricos, respuesta que está fuertemente dada a la cantidad de mgL^{-1} de la dosis, siendo la óptima para naranja entre 0,5 a 1 mgL^{-1} de BAP, mientras que para el limón y mandarina se comporta mejor en dosis de $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP. Por su parte Hernández-Jerez et al. (2013), obtuvieron los mismos resultados en limón (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. Mexicana), cuando se cultivaron los explantes en 2 mgL^{-1} de BAP acompañado de 1 mgL^{-1} de AG (ácido giberélico).

Tabla 5. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de *Citrus* multiplicadas *in vitro*.

Especie	Fitorregulador	Dosis (mgL^{-1})	Tratamiento	Número de brote	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)
Naranja	BAP	0,5	T1	$4,80 \pm 0,10$	$1,50 \pm 0,10$	$2,30 \pm 0,10$ cde
		0,75	T2	$3,20 \pm 0,50$	$1,80 \pm 0,20$	$2,40 \pm 0,10$ bcde
		1	T3	$3,90 \pm 0,40$	$1,50 \pm 0,10$	$2,10 \pm 0,10$ de
	KIN	0,5	T4	$1,30 \pm 0,30$	$1,30 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,00$ e
		0,75	T5	$1,50 \pm 0,40$	$1,90 \pm 0,10$	$2,50 \pm 0,00$ bcd
		1	T6	$1,00 \pm 0,00$	$1,80 \pm 0,10$	$2,60 \pm 0,20$ abc
Mandarina	BAP	0,5	T8	$1,60 \pm 0,30$	$1,90 \pm 0,00$	$2,10 \pm 0,10$ de
		0,75	T9	$2,50 \pm 0,60$	$2,20 \pm 0,30$	$2,80 \pm 0,30$ ab
		1	T10	$1,30 \pm 0,30$	$1,80 \pm 0,10$	$3,00 \pm 0,00$ a
	KIN	0,5	T11	$1,00 \pm 0,00$	$1,90 \pm 0,20$	$2,10 \pm 0,10$ de
		0,75	T12	$1,00 \pm 0,00$	$1,80 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,00$ e
		1	T13	$1,10 \pm 0,10$	$1,60 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,00$ e
Limón	BAP	0,5	T15	$2,30 \pm 0,40$	$1,50 \pm 0,30$	$1,30 \pm 0,30$ f
		0,75	T16	$2,10 \pm 0,70$	$1,20 \pm 0,10$	$1,50 \pm 0,20$ f
		1	T17	$2,90 \pm 0,50$	$1,40 \pm 0,10$	$1,40 \pm 0,20$ f
	KIN	0,5	T18	$1,10 \pm 0,10$	$1,60 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,10$ f
		0,75	T19	$1,40 \pm 0,40$	$1,70 \pm 0,20$	$1,40 \pm 0,10$ f
		1	T20	$1,30 \pm 0,30$	$1,60 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,10$ f
ANOVA						
Esp*Fitorregulador*Dosis (P)				0,0966	0,0964	0,0021

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)
Media \pm error típico de la muestra

En el análisis ortogonal generado para los tratamientos dentro de cada especie versus su propio testigo específico, los explantes de naranja cuyos tratamientos fueron estimulados con el efecto de BAP independientemente de las dosis (T1, T2 y T3),

respondieron significativamente en el número de brotes (4,80, 3,90 y 3,90 respectivamente) mientras que los tratamientos con efecto de KIN (T4, T5 y T6) fueron estadísticamente igual al testigo (T7), el cual únicamente contenía medio de cultivo MS. Sin embargo, en las especies de mandarina y limón ningún promotor hormonal utilizado causó variación estadística en comparación a sus respectivos testigos (Tabla 6). No obstante, en la longitud de los brotes en naranja, en los tratamientos con efecto hormonal, se reportan menores longitudes en comparación con el testigo. Mientras que en mandarina y limón no se reporta efecto significativo de los fitorreguladores de crecimiento, siendo estadísticamente igual el efecto de los tratamientos con BAP y KIN con los testigos específicos de estas dos especies.

Los resultados obtenidos marcan una brecha significativa en la eficiencia de respuesta de los tratamientos con BAP, comparándolo con el testigo (Tabla 6). Estos resultados fueron predecibles, de acuerdo con Redagráfica Chile (2020), definiendo a las BAP como citoquininas cuya función es inducir la división celular y la morfogénesis en cultivo de tejidos, activan el crecimiento de yemas laterales, entre otras. Por otro lado, los mejores efectos de KIN, se han encontrado en la etapa de fructificación, en aplicaciones de 1% en mandarinas de la variedad W. Murcott según explica el Ingeniero Agrónomo y asesor internacional en citricultura Joan Pons a través de la revista Redagráfica Chile (2020).

Vidal (2014), pudo determinar en la propagación de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* Christm.) a partir de segmentos nodales, que el mejor fitorregulador fue BAP en combinación con KIN, pero solo KIN presentó un 34% de explantes con brotes, siendo este un porcentaje bajo, explicando que este fitorregulador tiene efectos muy limitados. Mientras que, Noori & Latee (2020), reportaron que el mayor número de brotes y la mayor longitud de estos (5 brotes/explante y 5,1cm) se consiguió en el medio MS suministrado con 0,75 mgL⁻¹ de BA después de 4 semanas de cultivo en explantes de limón. Sin embargo, según los reportes de Goswami et al. (2013), la regeneración máxima de los brotes se observó con un nivel bajo de BAP (0,1 mgL⁻¹) o kinetina (0,5 mgL⁻¹) y a medida que aumentaban los niveles de citoquininas en el medio de cultivo hubo una disminución de la longitud y número de los brotes.

En otros estudios, Singh & Behl (2004) obtuvieron múltiples brotes en plantas maduras (5 a 6 años) de *Citrus reticulata* Blanco cv. Khasi mandarin y *C. limon* Burm.f.

cv. Assam lemon, cuando se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con 1,0 mgL⁻¹ de BAP, 0,5 mgL⁻¹ de kinetina y 0,5 mgL⁻¹ de ANA. Mientras que Mukhtar et al. (2005) reportan que la inducción de brotes fue mayor en el medio MS junto con 2 mgL⁻¹ de BAP.

Tabla 6. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) y de los testigos por cada especie sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de *Citrus* multiplicadas *in vitro*.

Especies	Tratamientos	Número de brote	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)	
Naranja (NA)	BAP 0,5	T1	4,80 ± 0,10 a	1,50 ± 0,10 bc	2,30 ± 0,10
	BAP 0,75	T2	3,90 ± 0,50 a	1,90 ± 0,20 ab	2,40 ± 0,10
	BAP 1,00	T3	3,90 ± 0,40 a	1,50 ± 0,10 ab	2,10 ± 0,10
	KIN 0,5	T4	1,30 ± 0,30 b	1,30 ± 0,00 c	2,00 ± 0,30
	KIN 0,75	T5	1,50 ± 0,40 b	1,90 ± 0,10 ab	2,50 ± 0,00
	KIN 1,00	T6	1,00 ± 0,00 b	1,80 ± 0,10 ab	2,60 ± 0,20
	Testigo	T7	1,00 ± 0,00 b	2,00 ± 0,30 a	2,40 ± 0,20
Mandarina (MA)	BAP 0,5	T8	1,60 ± 0,30	1,90 ± 0,00	2,10 ± 0,10
	BAP 0,75	T9	2,50 ± 0,60	2,10 ± 0,30	2,80 ± 0,30
	BAP 1,00	T10	1,30 ± 0,30	1,80 ± 0,10	3,00 ± 0,00
	KIN 0,5	T11	1,00 ± 0,00	1,90 ± 0,20	2,10 ± 0,10
	KIN 0,75	T12	1,00 ± 0,00	1,80 ± 0,00	2,00 ± 0,00
	KIN 1,00	T13	1,10 ± 0,10	1,60 ± 0,00	2,00 ± 0,00
	Testigo	T14	1,00 ± 0,00	2,20 ± 0,10	2,30 ± 0,10
Limón (LI)	BAP 0,5	T15	2,30 ± 0,40	1,50 ± 0,30	1,30 ± 0,30
	BAP 0,75	T16	2,10 ± 0,70	2,20 ± 0,10	1,50 ± 0,20
	BAP 1,00	T17	2,90 ± 0,50	1,40 ± 0,10	1,40 ± 0,20
	KIN 0,5	T18	1,10 ± 0,10	1,60 ± 0,10	1,30 ± 0,10
	KIN 0,75	T19	1,40 ± 0,40	1,70 ± 0,10	1,40 ± 0,10
	KIN 1,00	T20	1,30 ± 0,30	1,60 ± 0,10	1,30 ± 0,10
	Testigo	T21	1,40 ± 0,10	1,80 ± 0,10	1,30 ± 0,10

ANOVA

Testigo NA vs Resto de Trat NA (P)	<0,0001	0,0079	0,6759
Testigo MA vs Resto de Trat MA (P)	0,2608	0,6959	0,6015
Testigo LI vs Resto de Trat LI (P)	0,2166	0,0823	0,6015

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Media ± error típico de la muestra

El experimento mostró, que existe especificidad frente a fitorreguladores de crecimiento, lo que indica que existe diferencias significativas en la interacción especie x fitorregulador para la variable número de brotes, donde los mayores valores se obtuvieron en las combinaciones de las tres especies con BAP (4,20 / 1,80 y 2,40 respectivamente), en comparación con los tratamientos donde se adicionó KIN. No obstante, en el diámetro de los brotes a pesar de que la interacción fue significativa, se reporta mayor efecto del fitorregulador (Tabla 7).

En la interacción de los dos fitorreguladores x las tres dosis (0,50 / 0,75 y 1 mgL⁻¹), se reporta significancia estadística en la longitud de brotes, obteniendo mejor respuesta con la dosis 0,75 mgL⁻¹ de BAP. Y a pesar, que los tratamientos con el fitorregulador KIN fueron inferiores en menor longitud de brotes que el fitorregulador BAP, la dosis de 0,75 mgL⁻¹ de KIN también reportó mayor longitud, en comparación con las dosis de 0,50 y 1 mgL⁻¹ KIN (Tabla7).

Estos resultados evidencian, que los explantes presentan respuestas positivas ante el efecto de los fitorreguladores adicionados a los medios de cultivo, influyendo en los parámetros de crecimiento de las especies y no para las dosis evaluadas, destacando las diferencias significativas en las interacciones especie x fitorregulador y fitorregulador x dosis.

La respuesta de los explantes a las diferentes dosis de BAP, evidenció mejores resultados en la multiplicación, potenciando el número de brotes, longitud de brotes y diámetro de tallo de los cultivos *in vitro* (Tabla 7).

Scocchi et al. (2014), obtuvieron las mejores respuestas de regeneración de vástagos en naranja en los medios constituidos por la concentración de 1 mgL⁻¹ de BAP, 6 mgL⁻¹ de Sulfato de Adenina (SA) y 0.01-0.1 mgL⁻¹ de cinetina. Así mismo, se resalta que el cultivo de limón presentó respuesta medianamente positiva ante la dosificación con BAP, para el parámetro número de brotes (2 brotes, para las tres dosificaciones), lo que evidencia que el efecto más positivo de esta dosificación resultara de la aplicación de 2,5 mgL⁻¹ BAP, según Moura et al. (2001). Mientras que en los reportes de Al-Bahrany (2002), la multiplicación de brotes fue escasa en ausencia de BAP, incluso en los

tratamientos con presencia de kinetina. Concluyendo que de las dos citocininas probadas, el BAP fue responsables de la multiplicación de brotes *in vitro* en la lima.

Tabla 7. Efecto de la interacción doble (especie x fitorregulador/ especie x dosis/ fitorregulador x dosis) sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de *Citrus* multiplicadas *in vitro*.

Especie	Fitorregulador	Número de Brote	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)
Naranja	BAP	4,20 ± 0,20 a	1,60 ± 0,10	2,30 ± 0,10 bc
	KIN	1,30 ± 0,10 cd	1,60 ± 0,10	2,40 ± 0,10 ab
Mandarina	BAP	1,80 ± 0,30 c	2,00 ± 0,10	2,60 ± 0,10 a
	KIN	1,00 ± 0,00 d	1,70 ± 0,10	2,00 ± 0,00 c
Limón	BAP	2,40 ± 0,30 b	1,70 ± 0,20	1,40 ± 0,10 d
	KIN	1,30 ± 0,10 cd	1,60 ± 0,10	1,30 ± 0,10 d
Especie	Dosis	Número de Brote	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)
Naranja	0,50	3,00 ± 0,70	1,40 ± 0,10	2,20 ± 0,10
	0,75	2,70 ± 0,50	1,90 ± 0,10	2,40 ± 0,10
	1,00	2,40 ± 0,60	1,60 ± 0,10	2,40 ± 0,10
Mandarina	0,50	1,30 ± 0,20	1,90 ± 0,10	2,10 ± 0,10
	0,75	1,80 ± 0,40	2,00 ± 0,10	2,40 ± 0,20
	1,00	1,20 ± 0,10	1,70 ± 0,10	2,50 ± 0,20
Limón	0,50	1,70 ± 0,30	1,60 ± 0,20	1,30 ± 0,10
	0,75	1,80 ± 0,40	2,00 ± 0,10	1,40 ± 0,10
	1,00	2,10 ± 0,40	1,50 ± 0,10	1,30 ± 0,10
Fitorregulador	Dosis (mgL ⁻¹)	Número de brote	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)
BAP	0,50	2,50 ± 0,50	1,60 ± 0,10 bc	2,20 ± 0,10
	0,75	2,60 ± 0,40	2,00 ± 0,10 a	2,50 ± 0,10
	1,00	2,00 ± 0,40	1,70 ± 0,10 bc	2,60 ± 0,10
KIN	0,50	1,50 ± 0,20	1,70 ± 0,10 c	1,50 ± 0,20
	0,75	1,50 ± 0,30	1,90 ± 0,10 b	1,60 ± 0,10
	1,00	1,80 ± 0,30	1,50 ± 0,10 b	1,50 ± 0,10

ANOVA

Especie*Fitorreguladores (P)	0,0000	0,9356	0,0004
Especie*Dosis (P)	0,1838	0,2449	0,6176
Fitorreguladores*Dosis (P)	0,8228	0,0399	0,6433

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0,05)
Media ± error típico de la muestra

Los resultados del análisis de varianza sobre el efecto simple de los factores en estudio para las variables de número de brotes, longitud de brotes y diámetro de brotes reportan que, entre las especies de naranja, mandarina y limón, se presentó significancia estadística ($P < 0,05$), siendo la naranja la especie que reportó mayor número de brotes con aproximadamente 2,70 en comparación a limón y mandarina con 1,80 y 1,40 respectivamente. Sin embargo, en la longitud de brotes los explantes de mandarina con 1,90 cm fueron superiores estadísticamente a los explantes de naranja y limón. No obstante, el diámetro de los brotes entre naranja y mandarina presentó los mismos valores (2,30 cm) siendo estadísticamente iguales, pero difieren del diámetro de los brotes de limón (Tabla 8).

En relación, al efecto entre los fitorreguladores, el BAP presentó mejor efecto sobre los explantes en comparación a KIN, reportando estadísticamente mayor número de brotes (2,8 brotes). De la misma manera, se presenta una diferencia significativa en el diámetro de los brotes en comparación al fitorregulador KIN. No obstante, las dosis de fitorreguladores utilizadas no presentaron efecto significativo sobre el número de brotes, pero en la longitud y diámetro de estos con dosificaciones de $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ se reportaron resultados significativos en comparación a las demás dosis (Tabla 8).

Según Khyat et al. (2020), en la propagación *in vitro* de segmentos nodales de *Citrus aurantiifolia* cv. Sai Sharbati, se produjeron múltiples brotes cuando los explantes se cultivaron en medio Murashige y Skoog con $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP y $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA₃. Del mismo modo, la mayor longitud de los brotes (4,53 cm) y el mayor número promedio de hojas (5,03) se observó en este medio en comparación con otros. Mientras que Sujata et al. (2010) en un estudio similar demostraron que el BAP era la mejor citoquinina para la proliferación de brotes de cítricos. Resultados que se corresponden con lo mencionado por Muna et al. (1999), quienes consideran que la función del BA durante la multiplicación de brotes *in vitro* es romper la dominancia apical, estimular el crecimiento de nuevos brotes.

César et al. (2015) sostienen que uno de los factores más importantes que afectan al proceso de proliferación y enraizamiento de los explantes es el genotipo. Teoría que es confirmada por Gomes et al. (2010) y Scaltsoyiannes et al. (1998) cuando propagaron *in vitro* especies de *Citrus*.

Tabla 8. Efecto simple de los factores especie, fitorregulador y dosis sobre el número de brotes, longitud de brote y diámetro de brotes de tres especies de *Citrus* multiplicadas *in vitro*.

FACTOR	Número de brote	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)
Especie			
Naranja	2,70 ± 0,30 a	1,60 ± 0,10 b	2,30 ± 0,10 a
Mandarina	1,40 ± 0,20 c	1,90 ± 0,10 a	2,30 ± 0,10 a
Limón	1,80 ± 0,20 b	1,70 ± 0,10 b	1,30 ± 0,10 b
Fitorregulador			
BAP	2,80 ± 0,20 a	1,80 ± 0,10	2,10 ± 0,10 a
KIN	1,20 ± 0,10 b	1,70 ± 0,00	1,90 ± 0,10 b
Dosis (mgL⁻¹)			
0,5	2,00 ± 0,30	1,60 ± 0,10 b	1,80 ± 0,10 b
0,75	2,10 ± 0,30	1,90 ± 0,10 a	2,10 ± 0,10 a
1	1,90 ± 0,30	1,60 ± 0,10 b	2,10 ± 0,10 a
ANOVA			
Especie (P)	0,0000	0,0001	0,0000
Fitorreguladores (P)	0,0000	0,1319	0,0145
Dosis (P)	0,6926	0,0005	0,0175

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)
Media ± error típico de la muestra

6.3. Enraizamiento *in vitro*

Los resultados del análisis de varianza realizado para la interacción especie x fitorregulador x dosis, muestran diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en la variable longitud de raíces, mientras que para el número de raíces no se reportó significancia estadística (Tabla 9). Las mayores longitudes de raíces se obtuvieron con el tratamiento 11 (T11) que incluyó 0,50 mgL⁻¹ de AIA en explantes de mandarina. Mientras que en los tratamientos T4, T7 y T12, el efecto de los fitorreguladores no causó efecto en la presencia de raíces (Tabla 9). Sin embargo, se observa que en la mayoría de las interacciones los tratamientos que incluían ANA respondieron mejor que los que contenían AIA.

Los resultados observados en la Tabla 9, se corresponden con los reportes de Lluna (2006), que define a la hormona vegetal ANA como un compuesto auxínico, el en cual, una de las aplicaciones que se adjudican a estos compuestos es la estimulación de la formación de raíces, entre otros usos de interés agrícola. Mientras que, Oliva (2005), obtuvo resultados semejantes en su investigación, con aplicaciones de 400 ppm de ANA

acompañado de AIB, demostrando que el uso de hormonas auxínicas está históricamente empleado para el enraizamiento.

Taye et al. (2018), reportaron que el mayor número de raíces se produjo con 2 mgL⁻¹ de ANA, mientras que, la longitud de las raíces disminuyó con una mayor concentración de este fitorregulador. Sin embargo, Parthasarathy & Nagarju (1996), dedujeron que el medio MS suplementado con 0,05 mgL⁻¹ ANA resultó ser el mejor para el enraizamiento en muchas especies de cítricos. Mientras que Kour & Singh (2012) comprobaron que en *Citrus jambhiri* Lush., los brotes multiplicados *in vitro* pudieron enraizarse mejor en un medio suplementado con IBA y ANA (1 mgL⁻¹).

Tabla 9. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) sobre el número de raíces y longitud de raíces de dos especies de *Citrus* enraizadas *in vitro*.

Especie	Fitorregulador	Tratamientos	Dosis (mgL ⁻¹)	Número de raíces	Longitud de Raíces
Naranja	ANA	T1	0,5	3,00 ± 0,90	1,70 ± 0,70 ab
		T2	0,75	5,50 ± 2,10	1,90 ± 0,60 ab
		T3	1	2,50 ± 1,50	0,80 ± 0,50 bc
	AIA	T4	0,5	0,00 ± 0,50	0,00 ± 0,40 c
		T5	0,75	0,50 ± 0,80	0,40 ± 0,80 bc
		T6	1	0,80 ± 0,30	0,80 ± 0,40 bc
Mandarina	ANA	T8	0,5	0,00 ± 0,50	0,00 ± 0,20 c
		T9	0,75	2,50 ± 0,50	0,80 ± 0,10 bc
		T10	1	1,80 ± 0,40	1,10 ± 0,30 abc
	AIA	T11	0,5	1,00 ± 0,40	2,30 ± 1,10 a
		T12	0,75	1,30 ± 0,60	1,50 ± 0,50 abc
		T13	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 c

ANOVA

Esp*Fitorregulador*Dosis (P)

0,1640

0,0056

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0,05)

Media ± error típico de la muestra

En el análisis ortogonal generado para los tratamientos dentro de cada especie versus su propio testigo específico, los explantes de naranja cuyos tratamientos fueron estimulados con el efecto de ANA independientemente de las dosis (T1, T2 y T3), respondieron significativamente en el número de raíces, mientras que los tratamientos con efecto de AIA (T4, T5 y T6) fueron estadísticamente igual al testigo (T7), el cual

únicamente contenía medio de cultivo básico MS. Sin embargo, en la especie de mandarina ningún promotor hormonal utilizado causó variación estadística en comparación a su testigo (Tabla 10).

Los resultados obtenidos determinan los efectos positivos en el enraizamiento *in vitro* con la aplicación de ANA comparados con el testigo y con los tratamientos que incluían AIA en los medios con MS. Hummel et al. (2002) reportaron los máximos valores con 2 mgL^{-1} ANA y una disminución en la frecuencia de enraizamiento por debajo de esa dosis. Sin embargo, Karwa (2003) reporta un enraizamiento muy pobre y en algunas cosas nulo en el medio MS sin auxinas, demostrando que la aplicación exógena de auxinas era necesaria para el enraizamiento. Del mismo modo, Goswami et al. (2013), mencionan que el medio basal MS sin ningún regulador del crecimiento fue el mejor para el enraizamiento de explantes nodales de *Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan.

En otros estudios, Al-Bahrany (2002) menciona el efecto positivo de las fitohormonas en el enraizamiento *in vitro* de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing y que el porcentaje de enraizamiento más bajo se obtuvo en el medio sin hormonas. Ali & Bushra (2006), informaron que con $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA en medio MS, lograron la mayor inducción de raíces. Mientras que para Durán et al. (1989), las concentraciones adecuadas de ANA para el enraizamiento en naranja son de 1 mgL^{-1} , lo que coincide con el comportamiento de la naranja frente a las otras especies de *Citrus*. Evidenciando el comportamiento diferencial que presenta cada especie en relación con las dosis evaluadas.

Usman et al. (2006), comparando los niveles de ANA en explantes de tres especies de cítricos (*Citrus reticulata* L. Blanco, *Citrus limmetoides* L. y *Citrus sinensis* Osbeck), dedujo que el mayor porcentaje de enraizamiento (79,63%) se logró con el nivel más alto de ANA (10 mgL^{-1}), y que el aumento del nivel de ANA en el medio, incrementó significativamente el número de raíces por brote. Por su parte, Singh et al. (1994), concluyeron que en *C. reticulata* Blanco y *C. limon* Burm. f., el enraizamiento se veía favorecido en los medios que contenían ANA e IBA.

Tabla 10. Efecto de la interacción triple (especie x fitorregulador x dosis) y de los testigos por cada especie sobre el número de raíces y longitud de raíces de dos especies de *Citrus* enraizadas *in vitro*.

Especies	Tratamientos		Número de raíces	Longitud de raíces
Naranja (NA)	ANA 0,50	T1	3,00 ± 0,90 ab	1,70 ± 0,70
	ANA 0,75	T2	5,50 ± 2,10 a	1,90 ± 0,60
	ANA 1,00	T3	2,50 ± 1,50 ab	0,80 ± 0,50
	AIA 0,50	T4	0,00 ± 0,50 b	0,00 ± 0,40
	AIA 0,75	T5	0,50 ± 0,80 b	0,40 ± 0,80
	AIA 1,00	T6	0,00 ± 0,30 b	0,00 ± 0,40
	Testigo	T7	0,30 ± 0,00 b	0,50 ± 0,00
Mandarina (MA)	ANA 0,50	T8	0,00 ± 0,50	0,00 ± 0,20
	ANA 0,75	T9	2,50 ± 0,50	0,80 ± 0,10
	ANA 1,00	T10	1,80 ± 0,40	1,10 ± 0,30
	AIA 0,50	T11	1,00 ± 0,40	2,30 ± 1,10
	AIA 0,75	T12	1,30 ± 0,60	1,50 ± 0,50
	AIA 1,00	T12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Testigo	T14	0,50 ± 0,30	0,70 ± 0,30
ANOVA				
Testigo NA vs Resto de Trat NA (P)			0,0485	0,4557
Testigo MA vs Resto de Trat MA (P)			0,5112	0,6314

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)
Media ± error típico de la muestra

Los resultados del análisis de varianza sobre el efecto de la interacción doble, muestra que las combinaciones de los factores especie x fitorregulador reportó significancia estadística ($P < 0,05$) en las variables número y longitud de raíces donde los mayores valores se obtuvieron en la combinación de la especie naranja con el fitorregulador ANA en comparación con los tratamientos donde se adicionó AIA. En las demás interacciones no se reporta significancia estadística (Tabla 11). Estos resultados evidencian, que los explantes mostraron un efecto significativo en presencia de los fitorreguladores adicionados a los medios de cultivo influyendo en el enraizamiento *in vitro*.

El-Sawy et al. (2006), sostiene que la formación de raíces en microbrotes de cítricos se vio afectada por el efecto de los genotipos, fuentes de explante, fitorreguladores (ANA e IBA) y sus concentraciones. En general, hubo diferencias significativas en la respuesta al tipo de auxina y a la concentración. Y los explantes presentaron los más altos valores de enraizamiento cuando se suplementó el medio MS con $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA.

Salis et al. (2017) emplearon ANA para el enraizamiento *in vitro* de seis portainjertos de especies de *Citrus* logrando con la presencia de auxina un aumento significativo en el número de raíces por explante en todos los portainjertos estudiados. Los portainjertos *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon', Citrumelo 'Swingle' y *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' presentaron el mayor número de raíces por explante utilizando 2 ppm de ANA. En otro estudio, El-Sawy et al. (2006) reportan que la mayoría de los brotes obtenidos se enraizaron en medio MS suplementado con $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA. Mientras que Al-Bahrany (2002) observó que el número de raíces por explante en *Citrus aurantifolia* 'Swing' se incrementa con el aumento simultáneo de ANA en el medio, siendo 2 ppm la concentración óptima para el máximo número de raíces por explante.

Haripyaree et al. (2011) establecieron un protocolo de micropropagación eficiente para *Citrus megaloxycarpa* Lush, utilizando como medio de cultivo Murashige y Skoog con adición de varios fitorreguladores. Los brotes producto de la micropropagación, se enraizaron en un medio que contenía de 1 a 2 mg L^{-1} de AIA, IBA de ácido indol acético, ácido indol butírico y ANA. Siendo el ANA superior a otros reguladores del crecimiento para la inducción de raíces *in vitro*.

Tabla 11. Efecto de la interacción doble (especie x fitorregulador/ especie x dosis/ fitorregulador x dosis) sobre el número de raíces y longitud de raíces de dos especies de *Citrus* enraizadas *in vitro*.

Especie	Fitorregulador	Número de Raíces	Longitud de raíces
Naranja	ANA	3,70 ± 0,90 a	1,50 ± 0,30 a
	AIA	0,40 ± 0,30 b	0,40 ± 0,30 ab
Mandarina	ANA	1,40 ± 0,40 b	0,60 ± 0,20 ab
	AIA	0,80 ± 0,30 b	1,20 ± 0,50 b

Especie	Dosis (mgL ⁻¹)	Número de Raíces	Longitud de Raíces
Naranja	0,50	1,50 ± 0,70	0,90 ± 0,50
	0,75	3,00 ± 1,30	1,20 ± 0,50
	1,00	1,60 ± 0,80	0,80 ± 0,30
Mandarina	0,50	0,50 ± 0,30	1,10 ± 0,60
	0,75	1,90 ± 0,50	1,10 ± 0,30
	1,00	0,90 ± 0,30	0,50 ± 0,20

Fitorregulador	Dosis (mgL ⁻¹)	Número de Raíces	Longitud de Raíces
ANA	0,50	1,50 ± 0,60	0,90 ± 0,40
	0,75	4,00 ± 1,10	1,30 ± 0,40
	1,00	2,10 ± 0,70	0,90 ± 0,30
AIA	0,50	0,50 ± 0,30	1,10 ± 0,80
	0,75	0,90 ± 0,40	0,90 ± 0,40
	1,00	0,40 ± 0,00	0,40 ± 0,00

ANOVA			
Especie*Fitorreguladores (P)		0,0090	0,0075
Especie*Dosis (P)		0,9450	0,7923
Fitorreguladores*Dosis (P)		0,1863	0,5147

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0,05)
Media ± error típico de la muestra

El tipo y la concentración de auxinas adicionadas en los medios de cultivo desempeñan un papel fundamental en el enraizamiento de las plantas propagadas *in vitro* y se ven afectados por la especie vegetal y la variedad (George, 1996). La presencia de auxinas (incluyendo ANA o IBA), en los medios de cultivos es generalmente necesaria para promover el enraizamiento en los cultivos *in vitro* de varias especies de Cítricos (Carimi y De Pasquale, 2003).

Los resultados del análisis de varianza sobre el efecto simple de los factores en estudio para las variables número de raíces y longitud de raíces reportan que, entre las especies de naranja y mandarina, no se presentó significancia estadística ($P < 0,05$), con relación a los fitorreguladores, el ANA presentó mejor efecto sobre los explantes en comparación a AIA, reportando estadísticamente mayor número de raíces (2,50 raíces). No obstante, las dosis de fitorreguladores utilizadas no presentaron efecto significativo sobre la longitud de raíces mientras que en el número de raíces con la dosis de $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ se reportaron resultados significativos en comparación a las demás dosis (Tabla 12).

Se comprobó que el fitorregulador que mostró mayor eficiencia en el enraizamiento fue el ácido naftalenacético (ANA) a una dosis de $0,75 \text{ mgL}^{-1}$, el cual presentó diferencias significativas en el número de raíces, además de los mayores efectos en las variables con significancia estadística (Tabla 12). Lluna (2006), define a la hormona vegetal ANA como un compuesto auxínico, que tiene como función la estimulación de la formación de raíces, entre otros usos de interés agrícola. Mientras que Bhojwani y Razdan (1996) sostienen que, las auxinas más eficaces para el enraizamiento son el ANA, IBA y el AIA.

En otros estudios Starantino & Russo (1980), concluyeron que el enraizamiento en algunas variedades se ve favorecido por un medio que contenga más de una hormona, mientras que en otras sólo el ANA induce el enraizamiento. Oliva (2005), obtuvo resultados semejantes en su investigación, con aplicaciones de 400 ppm de ANA acompañado de AIB, demostrando que el uso de hormonas auxínicas está históricamente empleado para el enraizamiento.

Tabla 12. Efecto simple de los factores especie, fitorregulador y dosis sobre el número de brotes, longitud de brotes y diámetro de brotes de tres especies de *Citrus* enraizadas *in vitro*.

FACTOR	Número de raíces	Longitud de raíces
Especie		
Naranja	2,10 ± 0,60	1,00 ± 0,20
Mandarina	1,10 ± 0,20	1,00 ± 0,20
Fitorregulador		
ANA	2,50 ± 0,50 a	1,00 ± 0,20
AIA	0,60 ± 0,20 b	0,80 ± 0,30
Dosis (mgL⁻¹)		
0,50	1,00 ± 0,40 b	1,00 ± 0,40
0,75	2,40 ± 0,70 a	1,10 ± 0,30
1	1,30 ± 0,40 b	0,60 ± 0,20
ANOVA		
Especie (P)	0,0682	0,9902
Fitorreguladores (P)	0,0002	0,4779
Dosis (P)	0,0379	0,3903

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Media ± error típico de la muestra

7. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un protocolo de establecimiento *in vitro* para tres especies de *Citrus*.
2. El efecto del BAP en todas las dosis tuvo un efecto significativo en el número, longitud y diámetro de brotes en la multiplicación *in vitro* de naranja criolla.
3. La adición de $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA al medio de cultivo favoreció el enraizamiento *in vitro* de los explantes.

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar una adecuada selección y desinfección de frutos para evitar la contaminación microbiana en medios de cultivo.
2. Probar diferentes dosis de citoquininas en combinación con otras hormonas para acelerar y aumentar el proceso de multiplicación.
3. Continuar con evaluaciones de estas hormonas en interacción con los parámetros de crecimiento que se vieron mayormente beneficiados
4. Probar otras concentraciones de auxinas en función a la combinación de hormonas para determinar su eficiencia en el enraizamiento.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ali, S., & Mirza, B. (2006). Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Botanica Croatica*, 65(2), 137-146.
2. Almeida, W. A. B., Mourão Filho, F. de A. A., Mendes, B. M. J., & Rodriguez, A. P. M. (2002). *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2), 240-245.
<https://doi.org/10.1590/s0103-90162002000100004>
3. Al-Bahrany, A. M. (2002). Effect of phytohormones *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*, 95(4), 285-295.
https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Effect+of+phytohormones+on+in+vitro+shoot+multiplication+and+rooting+of+lime+Citrus+aurantifolia+%28Christm.%29+Swing&btnG=
4. Amoo, S. O., Aremu, A. O., & van Staden, J. (2012). *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111(3), 345–358.
<https://doi.org/10.1007/s11240-012-0200-3>
5. Amórtegui, I. (2001). El cultivo de los cítricos. Corporación para la Promoción del Desarrollo Rural y Agroindustrial del Tolima. Editores e Impresiones El Poira SA, Ibagué, Tolima.
<http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4055/2/El%20cultivo%20de%20los%20citricos%20Limon.pdf>

6. Ancillo, G., & Medina, A. (2015). Monografías botánicas Los cítricos. Universidad de Valencia. http://jardibotanic.org/index.php?apid=llibres-49&pubt=2&id=84&idioma=_spa#.X9mQtWhKjIU
7. Azcón -Bieto, J., Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Fisiología de las plantas y el estrés (2nd ed.) Interamericana-McGraw-Hill. http://jardibotanic.org/index.php?apid=llibres49&pubt=2&id=84&idioma=_spa#.X9mQtWhKjIU
8. Aznar, J. S. (1999). Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. https://valencia.consellagrari.com/wpcontent/uploads/2017/10/citricos_identificacio%CC%81n.pdf
9. Beltrán, J., Arrieta, E., & Rico, H. (2005). Producción de plántulas de limón criollo (*Citrus aurantifolia*) mediante la técnica de micropropagación *in vitro*. Tesis de pregrado, Universidad de Sucre, Sincelejo. <https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/656/1/T634.3748%20A775.pdf>
10. Bhojwani, SS., y Razdan, MK. (1996). Cultivo de tejidos vegetales: Teoría y práctica, *Edición revisada*. Elsevier, Amsterdam, Lausana, Nueva York, Oxford, Shannon, Tokio, 767 p.
11. Bisang, R. (2009). Biotecnología y desarrollo. CEPAL- *Colección Documentos de Proyectos*, 2(1), 34. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/365>
12. Beura, S., Singh R and Jagadev, P. (2003). *In vitro* multiplication studies in gladiolus cv. American Beauty. *Orissa Journal of Horticulture* 31, p.101-105.
13. Cano, S., & Carlos, G. (2004). Biotecnología y propiedad intelectual en el agro (No. LC-0079). Ministerio de Agricultura.

- https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/30003/59337_26271.pdf?sequence=1&isAllowed=y
14. Castillo, M. C. (2013). Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés [Tesis doctoral, Universidad de Alicante].
https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/35678/1/Tesis_Cano_Castillo.pdf
 15. Castro, M. (2005). Curso práctico de injertos. Ediciones Ripalme.
<http://www.lamandala.cl/index.php/2015/12/30/libro-curso-practico-de-injertos-paso-a-paso/>
 16. Carimi, F. De and F., Pasquale. (2003). Micropropagation of *Citrus*. In Micropropagation of woody trees and fruits. Jain, S.M. & K. Ishii. Kluwer, *the Netherlands*, p. 589-619.
 17. Cézar, T. M., Higa, A. R., Koehler, H. S., & Ribas, L. L. F. (2015). Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda* L. *Ciência Florestal*, 25(1), 13-22.
 18. Chamandoosti, F. (2020). *Citrus* tissue culture with two different approaches. *International Journal of Biosciences and Biotechnology*, 8(1), 19.
<https://doi.org/10.24843/ijbb.2020.v08.i01.p03>
 19. Cleves Leguízamo, J. A., Orduz Rodríguez, J. O., & Fonseca Carreño, J. A. (2012). Aportes de la investigación en cítricos al manejo agroecológico del cultivo en el piedemonte del departamento del Meta, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 85. <https://doi.org/10.22490/21456453.945>
 20. Cleves-Leguízamo, JA y Jarma-Orozco, A. (2014). Caracterización y tipificación de sistemas de producción de cítricos en el departamento del Meta. *Agronomía Colombiana*, 32 (1), 113-121.

21. Durán-Vila, N., Ortega, V., & Navarro, L. (1989). Morphogenesis and tissue cultures of three *citrus* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(2), 123-133.
22. El-Sawy, A., Gomaa, A., Reda, A. y Danial, N. (2006). Embriogénesis somática y regeneración vegetal a partir de óvulos no desarrollados de cítricos. *Arab J Biotech*, 9(2), 189-202.
23. FAO, (1967). Food and Agricultural Organization of the United Nations. The state of food and agriculture. Rome, Italy.
24. FAO, (2010). Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Departamento Económico y Social. <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0w.htm>
25. FAOSTAT, (2019). Evaluación de la producción de cítricos 2017 – informe principal. Estudio FAO: *Montes Núm. 10* (3), 140. Roma, Italia. www.fao.org/citricultura/site/7949/en/.
26. Gella, R., & Errea, P. (1998). Application of *in vitro* Therapy for Ilarvirus Elimination in Three Prunus Species. *Journal of Phytopathology*, 146(8–9), 445–449. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04779>.
27. Gereme Taye, M., Debesay, B., Tesfahun, Y., & Brhanu, A. (2018). Optimization of an *in vitro* Regeneration Protocol for *Rough Lemon* Rootstock (*Citrus jambhiri* L.) *Direct Organogenesis*. *Advances in Crop Science and Technology*, 06(01), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000329>
28. George, E. F., & Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: Uses and Methods in Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. *Journal of Phytopathology*, 2(1), 29-32.

29. George, E. F. (1996). Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice. Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice., (Ed. 2).
30. Gomes, F., Simões, M., Lopes, ML y Canhoto, JM (2010). Efecto de reguladores del crecimiento vegetal y genotipo sobre la micropropagación de árboles adultos de *Arbutus unedo* L. (madroño). *Nueva biotecnología*, 27(6), 882-892.
31. González, C., & Vilca, J. (1998). Micropropagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*). Red Andina de Semillas Forestales Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. (RASEFOR). Asociación Civil para la Investigación y Desarrollo Forestal (ADEFOR), *Cajamarca*,4(3),46.
32. Goswami, K., Sharma, R., Singh, P. K., & Singh, G. (2013). Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. *Kaghzi Kalan*) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Physiology and Molecular. Biology of Plants*, 19(1), 137-145.
33. Haripyaee, A., Guneshwor, K., Sunitibala, H., & Damayanti, M. (2011). *In vitro* propagation of *Citrus megaloxycarpa*. *Envir. Exper. Biol*, 9, p.129-132.
34. Hernández-Jerez, Y., Silva Pupo, J. J., & Borges, M. (2013). Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (vtc). *Biotegnología Vegetal*, 13(3), 181–187. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/116>
35. Herrera, E., P. A., & Rico, P. H. E. (2005). Producción de plántulas de limón criollo (*Citrus aurantifolia*) mediante la técnica de micropropagación *in vitro* [Tesis Doctoral, Universidad de Sucre]. <https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/656/1/T634.3748 A775.pdf>

36. Holdgate, DP y Zandvoort, EA (1992). Micropropagación automatizada y aplicación de rayo láser para corte en sistemas de producción de trasplantes, *Springer Dordrecht*, p. 297-311.
37. Howell, S. H., Lall, S., & Che, P. (2003). Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science*, 8(9), 453-459.
38. Hummel, I., Couée, I., El Amrani, A., Martin-Tanguy, J., & Hennion, F. (2002). Involvement of polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica*. *Journal of Experimental Botany*, 53(373), 1463-1473.
39. INEC. (2018). Contenido Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2018. In Inec. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion de principales resultados.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion_de_principales_resultados.pdf)
40. Jenik, P. D., & Barton, M. K. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development*, 132(16), 3577-3585.
41. Jesús, M. De, Alonso, A., Moctezuma, L., Rosas, M., Martínez-hernández, M. D. J., López, A. A., & Osorio-acosta, F. (2006). Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Redalyc*, 31(8), 616–619. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33911911.pdf>
42. Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). *Fisiología Vegetal*, p. 1-28.
43. Karwa, A. (2003). Propagación *in vitro* de *Citrus reticulata* Blanco (mandarina Nagpur). *Ind. J. Genet. Plant Breed*, 63(1), 187-188.
44. Khyat, J., Harishchandra, S. S., & Biotech, G. (2020). *In vitro* propagation of *Citrus aurantiifolia* cv. SAI. *Juni Khyat (UGC Care Group I Listed)*, 10(15), 249–258. http://www.junikhyat.com/no_15_jun_20/35.pdf?i=1

45. Kour, K., & Singh, B. (2012). *In vitro* multiplication of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 1(4), 5-9.
46. Krueger, R. R., & Navarro, L. (2007). *Citrus* germplasm resources. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, p. 45-140.
47. Levitus, G. (2010). IV. Capítulo 1 Micropropagación. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Capítulo: Micropropagación*, 1(1), 353–362.
48. Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of Citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, 11(6), 530-545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
49. Lluna, R. (2006). Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Horticultura*, p. 22-26. http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh196_2/22_27.pdf
50. Morín, C. (1985). Cultivo de Cítricos. 2da. Edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/452/1/citricos.pdf>
51. Moura, T. L. De, Almeida, W. A. B. De, Mendes, B. M. J., & Mourão Filho, F. D. A. A. (2001). Organogênese *in vitro* de *citrus* em função de concentrações de bap e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2), 240–245. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452001000200007>
52. Mukhtar, R., Khan, M. M., Rafiq, R., Shahid, A., & Khan, F. A. (2005). *In vitro* regeneration and somatic embryogenesis in (*Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*). *International Journal of agriculture and Biology*, 7(3), 518-520.

53. Muna, A. S., Ahmad, A. K., Mahmoud, K., & Abdul-Rahman, K. (1999). *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(3), 203-208.
54. Niedz, R. P., & Pierce, F. (2008). *In Vitro* Germination of *Citrus* Seed. Proceeding of the Florida State Horticulture Society, 121(1), 148–151. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Niedz%2C+R.+P.+%282008%29.+In+vitro+germination+of+Citrus+seed.+In+Proceedings+of+the+Florida+State+Horticultural+Society%2C+148-151.&btnG=
55. Noori, A. M., & Lateef, M. A. A. (2020). *In vitro* multiplication of *Citrus lemon* L. with different 6-Benzylaminopurine (BA) concentrations. *Plant Archives*, 20(2), 6966–6968. [http://www.plantarchives.org/20-2/6966-6968 \(6986\).pdf](http://www.plantarchives.org/20-2/6966-6968%20(2).pdf)
56. Núñez, L. M., & Mariño, J. G. (2008). Micropropagación vegetal. *Universidade de Vigo*, 3(12), 60–53. http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo_2008_07.pdf
57. Oliva, C. (2005). Efecto de los ácidos naftalenacético e indolbutírico en el enraizamiento de estacas de *Myrciaria dubia* (HBK) mc vaugh, camucamu. *Folia amazónica*, 14(2), 27-33. <http://revistas.iiap.org.pe/index.php/foliaamazonica/article/view/144/205>
58. Palacios, J. (1978). *Citricultura moderna*, Jorge Palacios (No. 634.3 P3.). Hemisferio Sur. Buenos Aires. AR. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=PALACIOS%2C+J.+1978.+Citricultura+Moderna.+Edit.+Hemisferio+Sur.+Argentina.+Pag.+1-2.&btnG=
59. Parthasarathy, V. A., & Nagaraju, V. (1996). Rooting of microcuttings of certain *citrus* species. *Indian Journal of Horticulture*, 53(4), 255-258.

60. Peryeda, J., Noriega, D., Gozales, R., & Lopez, M. D. (2014). Producción Orgánica de Limón Mexicano. Guerrero-México: Inifap. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Peryeda%2C+J.%2C+Noriega%2C+D.%2C+Gozales%2C+R.%2C+%26+Lopez%2C+M.+D.+%282014%29.+Producci%C3%B3n+Org%C3%A1nica+de+Lim%C3%B3n+Mexicano.&btnG=
61. Pierik, R. L. M. (1990). Producción de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, RLM (Ed.) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: *Ediciones Mundi-Pronsa*, p. 169-180.
62. Pullas, D. (2011). “Propagación clonal de aguacate duke 7 (*Persea americana mill.*) Mediante la técnica de etiolación de brotes o cultivo *in vitro*” Tesis de pregrado, Sangolquí-Ecuador. https://aggie-horticulture.tamu.edu/faculty/davies/pdf_stuff/ph_final_galley/frontmatter-front01_davi4493_08_se_fm.pdf
63. Redagícola Chile. (2020). Estrategias para obtener un huerto de mandarinas más productivo y con fruta de calidad. Redagícola Cítricos. Retrieved from <https://www.redagricola.com/cl/estrategias-para-obtener-un-huerto-de-mandarinas-mas-productivo-y-con-fruta-de-calidad/>
64. Rincón, A. M., Vásquez, A. M., & Padilla, F. C. (2005). Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 55(3), 305–310.
65. Rodríguez, A. J., Rodríguez, A., Quintero, S., Torres, M. D. L. A., & Fundora, Z. (2004). Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (*Musa spp.*) y malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.). *Cultivos Tropicales*, 25(1), 23-26.

66. Rojas, P. (2001). Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC). Tesis Mg. Sc. Cordoba, ME, Universidad Veracruzana. <https://148.226.24.32/bitstream/handle/123456789/8727/RojasMencioPaula.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
67. Ruchitha, T., & Poojashree, S. (2021). Impact of plant growth regulators in propagation of fruit crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *10*(1), 838–842.
68. Salis, C., Papadakis, I. E., Kintzi1os, S., & Hagidimitriou, M. (2017). *In vitro* propagation and assessment of genetic relationships of *Citrus rootstocks* using ISSR molecular markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *45*(2), 383–391. <https://doi.org/10.15835/nbha45210900>
69. Singh, A., Saini, M. L., & Behl, R. K. (2004). *In vitro* screening of *Citrus rootstocks* for salt tolerance. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, *64*(1), 54-57.
70. Singh, S., Ray, B. K., Bhattacharyya, S., & Deka, P. C. (1994). *In vitro* propagation of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm. f. *Hort Science*, *29*(3), 214-216.
71. Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, K. P., & Moulalis, D. (1998). Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica*, *46*(2), 326-331.
72. Scocchi, A., Faloci, M., Medina, R., Olmos, S., & Mroginski, L. (2004). Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica*, *135*(1), 29-38.

73. Starantino, A., & Russo, F. (1980). Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits polyembryonic *citrus* cultivars. *Hort. Science*, 15, p.296-297.
74. Starrantino, A. and Russo, F. (1980) Seedlings from Undeveloped Ovules of Ripe Fruits of Polyembryonic *Citrus* Cul- tivars. *Horticulture Science*, 15, 296-297.
75. Stoller, J., (2008). Guía Stoller de la Sanidad Vegetal. Maximizando la expresión genética de la planta. Crop Health Leader.<https://fisiologiavegetal.es/2013/05/que-es-la-terapia-de-sanidad-vegetal/guia-stoller-para-aumentar-el-poder-de-la-planta-1/>
76. Sujata U, Syamal MM and Hamidullah I. 2010. Micropropagation of sweet orange cv. Mosambi through shoot tips and nodal segments. *Indian Journal of Horticulture* 67(4): 21-25.
77. Upadhyay, S., Syamal, M. M., & Itoo, H. (2010). Micropropagation of sweet orange cv. Mosambi through shoot tips and nodal segments. *Indian J. Hort*, 67, p. 21-25.
78. Usman, M., Muhammad, S., & Fatima, B. (2006). *In Vitro* Multiple Shoot Induction From Nodal Explants of *Citrus* Cultivars. *Journal of Central European Agriculture*, 6(4), 435–442. <https://doi.org/10.5513/jcea.v6i4.320>
79. Vanegas, M. D. J. (2002). Guía Técnica Cultivo del Limón Pérsico. Instituto Interamericano De Cooperación Para La Agricultura (IICA) <http://hdl.handle.net/123456789/285>.
80. Valarezo Concha, A., Valarezo Cely, O., Mendoza García, A., & Alvarez, H. (2014). Guía técnica sobre el manejo de los cítricos en el Litoral ecuatoriano.
81. Vega, J. (1997). Regeneración *in vitro* de Naranja Agrio (*Citrus aurantium* Linn.). Tesis de Grado, San Nicolas de Garza, Nueva León. Retrieved from <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080080882.PDF>

82. Vidal, M. (2014). Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales. Tesis de pregrado, Zamorano, Honduras.
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3519/1/CPA-2014-087.pdf>
83. Went, F. W., & Thimann, K. V. (1937). Phytohormones. MacMillan Company, Nueva York. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19381601765>
84. Zaragoza, S. (1993). Pasado y presente de la citricultura española. Generalitat Valenciana. Valencia (España). <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=INIA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=006237>