

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ		APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): JULEISY ASTRID APELLIDOS: RODRÍGUEZ BURGOS

NOMBRE(S): GERSON DAMIAN APELLIDOS: ORTIZ CARRILLO

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): ALINA KATIL APELLIDOS: SIGARROA RIECHE

TÍTULO DEL TRABAJO (MONOGRAFIA): LA MICROINJERTACIÓN EN CÍTRICOS COMO TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS

La Técnica de Microinjertación *in vitro* permite la multiplicación de plantas libres de virus. El objetivo general de esta investigación es profundizar en el conocimiento de la Técnica de Microinjertación mediante CTV como herramienta para la obtención de plantas de cítricos libres de virus. La investigación se realizó entre los meses de abril y septiembre del 2021 usando como bases de datos Scielo, Google scholar, Google, se propuso un margen de información de aproximadamente 15 años sobre la técnica de microinjertación en cítricos. La microinjertación *in vitro* tiene diferentes técnicas para lograr ensamblar el patrón con el ápice; la técnica más común para la mayoría de autores es la técnica de “T invertida”, además el medio de cultivo MS demuestra una gran eficacia para las técnicas de cultivos *in vitro*, pero también, el medio de cultivo MG al tener gran presencia de citoquininas que regulan el desarrollo y permiten la formación de tallo en explantes, formación de hojas; las hormonas de crecimiento es un factor demasiado importante para los cultivos *in vitro*, especialmente en la técnica de microinjerto, pero además de eso se debe tener en cuenta la cantidad de Sacarosa, pues si se aplica demasiada concentración esta puede formar Floema pero no forma Xilema, y sí se aplica muy baja concentración se formará Xilema pero no formará Floema, por todo esto se recomienda usar una concentración entre 25-30 g/L.

PALABRAS CLAVES: Microinjertación, Cítricos, Citoquininas, Sacarosa.

PÁGINAS: 49

PLANOS: 0

ILUSTRACIONES: 3

CD ROOM: 0

LA MICROINJERTACIÓN EN CÍTRICOS COMO TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL
VEGETAL LIBRE DE VIRUS

GERSON DAMIAN ORTIZ CARRILLO
JULEISY ASTRID RODRÍGUEZ BURGOS

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2021

LA MICROINJERTACIÓN EN CÍTRICOS COMO TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL
VEGETAL LIBRE DE VIRUS

GERSON DAMIAN ORTIZ CARRILLO
JULEISY ASTRID RODRÍGUEZ BURGOS

Monografía de investigación presentado como requisito para obtener el título de:
Ingeniero Biotecnológico

Directora
ALINA KATIL SIGARROA RIECHE

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2021

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 02 NOVIEMBRE DE 2021

HORA: 05:00 P.M.

LUGAR: CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “LA MICROINJERTACIÓN EN CÍTRICOS COMO TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS.”

MODALIDAD: MONOGRAFIA

JURADO: LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO
ADRIANA ZULAY ARGUELLO NAVARRO
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

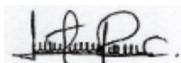
ENTIDAD: UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

DIRECTOR: ALINA KATIL SIGARROA RIECHE

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
JULEISY ASTRID RODRÍGUEZ BURGOS	1611158	4.2

OBSERVACIONES: APROBADA.

FIRMA DE LOS JURADOS



Lilian Trinidad Ramirez Caicedo Adriana Zulay Arguello Navarro Juan Carlos Ramirez Bermúdez



Vo. Bo Coordinador Comité Curricular _____

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 18 febrero de 2022

HORA: 09:00 A.M.

LUGAR: CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “LA MICROINJERTACION EN CÍTRICOS COMO TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS.”

MODALIDAD: MONOGRAFIA

JURADO: LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO
ADRIANA ZULAY ARGUELLO NAVARRO
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

ENTIDAD: UFPS

DIRECTOR: ALINA KATIL SIGARROA RIECHE

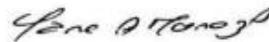
NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Gerson Damián Ortiz Carrillo	1611147	4.4

OBSERVACIONES: APROBADA.

FIRMA DE LOS JURADOS



Lilian Trinidad Ramirez Caicedo Adriana Zulay Arguello Navarro Juan Carlos Ramirez Bermúdez



Vo. Bo Coordinador Comité Curricular _____



**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN
ELECTRONICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta,

Señores
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
Ciudad

Cordial saludo:

Juleisy Astrid Rodriguez Burgos, Gerson Damián Ortiz Carrillo, identificado(s) con la C.C N° 1093777922, 1090516399, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado LA MICROINJERTACION EN CITRICOS COMO TECNICA PARA OBTENER MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS presentado y aprobado en el año 2021 como requisito para optar al título de Ingeniero(a) Biotecnológico(a); autorizo(amos) a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que **"los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores"**, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

FIRMA Y CEDULA

AGRADECIMIENTOS

Juleisy Astrid Rodríguez Burgos

Agradezco primero a Dios por permitirme culminar con éxito una etapa más de mi vida, que requirió de sacrificio, esfuerzo y entrega.

A mi madre *Lilia Burgos Báez*, por ser mi motor, por darme su apoyo incondicional, pese a las adversidades e inconvenientes que se han presentado, por su amor, su paciencia y motivación brindada en el transcurso de mi carrera profesional.

A mis hermanos *Diego Fernando, Leidy Karina y Laura Katherine Burgos*, por su motivación, su compañía, su apoyo incondicional y mi fuerza para lograr esta meta.

A la directora del proyecto la Ingeniera *Alina Katil Sigarroa Rieche* que, gracias a su experiencia y conocimiento me orientó en la investigación, por su paciencia, dedicación y enseñanzas en el transcurso de este trabajo.

A mi compañero *Gerson Damián Ortiz Carrillo*, por el compromiso y acompañamiento en el desarrollo del trabajo y por brindarme su amistad.

A cada uno de los docentes que hicieron parte de mi formación profesional, por el apoyo que me brindaron y por darme a conocer sus conocimientos.

A todos mis compañeros y amigos; *Dengoncof, Claudia, Yuder, Laura, Alejandra, Dayana y Christian N*, por el acompañamiento en el transcurso de la carrera y su apoyo incondicional.

Gerson Ortiz

Siempre estaré agradecido con Dios, porque gracias a Él he logrado cada objetivo en mi vida, y me ha permitido estar presente en este nuevo logro.

Gracias a mi mamá *Gladys Yamile Carrillo Parada* y a mi papá *Luis Alirio Ortiz Rodríguez*, por formar el hombre que soy en este momento y enseñarme a llevar la vida, a ser constante y motivarme a no rendirme; también gracias a ellos puedo cumplir este objetivo profesional que los tres anhelamos desde muchos años atrás, Dios me los bendiga muchísimo.

También debo agradecer a toda mi familia que me apoyó desde que era niño, especialmente a *María Parada, Katherine Carrillo, Oneida Gómez, Guillermo Ortiz*; mis primos *Guillermo, Angélica, Majo, José, Diana*.

Juleisy gracias por haber aceptado este proyecto conmigo, ha sido un proceso difícil y complicado, pero sé que llegará a ser una gran profesional y excelente persona.

A nuestra directora la Ingeniera *Alina Sigarroa*, por aceptarnos el proyecto, asesorarnos y corregirnos en todo este proceso.

Todos mis amigos y compañeros de la carrera *Dayana, Laura, Numa, Daniel, Yuder, Alejandra, Claudia, Cristian, Dengo, Luisa, Camila, Neni y Monica*; gracias por su compañerismo y apoyo en los peores momentos, además agradezco la paciencia que tuvieron en toda la carrera, confiaré en que ustedes serán personas muy exitosas.

Por último, agradezco a *José Ricardo, Rubén, Sebas, García, Daniela, Gerson Romero, Yurley, Camilo, Lesmes, Daniel Fernández* y a muchos más por su amistad, lealtad y por todos sus consejos y motivaciones para no rendirme.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1 Objetivos	16
1.1 Objetivo general	16
1.2 Objetivos específicos	16
2 Metodología	17
2.1 Método de investigación	17
2.1.1. Técnicas e instrumento de recolección y selección de información	17
2.2 Fuentes de información y Delimitación	17
2.3 Selección y organización de la información	18
2.3.1 Elaboración de fichas bibliográficas	18
2.3.2. Organización de la información pertinente y relevante por medio de tabla con categorías iniciales	18
2.4 Análisis de la información	19
3 Resultados y análisis	19
3.1 La microinjertación como técnica de propagación asexual en cítricos	19
3.1.1. El patrón o portainjerto	20
3.1.2. Injerto o yema injertada	21
3.1.3. Etapas y condiciones básicas para el establecimiento <i>in vitro</i> exitoso de un microinjerto de cítrico	21
3.1.3.1. Selección y Preparación del patrón o portainjerto	21
3.1.3.2. Selección y Preparación del ápice o yema a injertar	22
3.1.3.3. Injertación (Elección del método y ejecución del proceso)	23
3.1.3.4. Desarrollo <i>in vitro</i> de las plantas injertadas	24
3.1.3.5. Adaptación <i>ex vitro</i> (Trasplante a suelo)	27
3.2 Métodos empleados para microinjertación en cítricos.	27
3.2.1 Tipos, descripción y ventajas	32
3.3 Avances prácticos en la microinjertación de cítricos	33
4 Conclusiones	38
5 Bibliografía	39
6 ANEXOS	44

Lista de Tablas

Tabla 1. Palabras claves para la búsqueda de los artículos	17
Tabla 2. Métodos de Microinjertación	28
Tabla 3. Fichas Bibliográficas	44

RESUMEN

La Técnica de Microinjertación *in vitro* permite la multiplicación de plantas libres de virus. El objetivo general de esta investigación es profundizar en el conocimiento de la Técnica de Microinjertación mediante CTV como herramienta para la obtención de plantas de cítricos libres de virus. La investigación se realizó entre los meses de abril y septiembre del 2021 usando como bases de datos Scielo, Google Scholar, Google, se propuso un margen de información de aproximadamente 15 años sobre la técnica de microinjertación en cítricos. La microinjertación *in vitro* tiene diferentes técnicas para lograr ensamblar el patrón con el ápice; la técnica más común para la mayoría de autores es la técnica de “T invertida”, además el medio de cultivo MS demuestra una gran eficacia para las técnicas de cultivos *in vitro*, pero también, el medio de cultivo MG al tener gran presencia de citoquininas que regulan el desarrollo y permiten la formación de tallo en explantes, formación de hojas; las hormonas de crecimiento es un factor demasiado importante para los cultivos *in vitro*, especialmente en la técnica de microinjerto, pero además de eso se debe tener en cuenta la cantidad de Sacarosa, pues si se aplica demasiada concentración esta puede formar Floema pero no forma Xilema, y si se aplica muy baja concentración se formará Xilema pero no formará Floema, por todo esto se recomienda usar una concentración entre 25-30 g/L.

Palabras Claves: Microinjertación, Cítricos, Citoquininas, Sacarosa

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país que posee grandes ventajas con su ubicación geográfica, en todo el territorio existe una variedad de suelos, clima y diversidad en flora y fauna, por esto la agricultura es tema muy importante para el desarrollo económico de la nación (Sandoval & Vargas, 2016); los cítricos tienen una gran importancia a partir del año 2018 debido a que cada vez es más apetecido por países extranjeros, Estados Unidos es uno de ellos, por eso se ha buscado mejorar las condiciones del producto final (Vega, 2018); los cítricos que se producen en Colombia comúnmente son (1) Limón, (2) Mandarina y (3) Naranja (Ministerio de Agricultura, 2019), entre el Limón hay variedades como el limón Pajarito (*Citrus aurantifolia*) y el limón Tahití (*Citrus latifolia tanaka*) (Coronado, & Rodríguez, 2016).

Como sabemos los cultivos de varios cítricos son atacados a menudo por variedad de plagas y enfermedades, algunas de ellas son transmitidas o causadas por Hongos, Bacterias y Nematodos, también están las generadas por virus, viroides y fitoplasmas (Castro *et al.*, (2000)), todos estos pueden causar grandes daños económicos en las diferentes zonas de producción de estos cítricos. Por lo general causan pérdida de vigor y vida corta de los árboles, disminución de la producción, baja calidad de la fruta, restringen el uso de muchos patrones y en varios casos causan la muerte de los árboles. Como consecuencia de estos daños se pueden convertir en factores limitantes importantes para la producción y generan un gran impacto económico, las enfermedades más importantes son: *Phytophthora* sp., los virus como: virus de la tristeza de los cítricos (CTV), exocortis (CEV) y psorosis (CPsV), y la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causante de la enfermedad Huanglongbing “HLB” (Vidal, 2015). La enfermedad de HLB tiene en alerta a los agricultores de cítricos y al ICA es la enfermedad HLB, según el Ingeniero Jaime Cárdenas en una entrevista, comentó respecto a esta enfermedad e incluso mencionó que es transmitida por un

insecto vector llamado *Diaphorini citri* (Cárdenas, 2019); a Colombia la enfermedad llegó posiblemente por Paraguachón, se han encontrado casos de esta enfermedad en La Guajira y en Norte de Santander donde uno de los cítricos es el Limón Tahití (*Citrus latifolia tanaka*) el cuál este es atacado por esta enfermedad, además es riesgoso pues esta enfermedad no registra una cura y la única solución que se ha propuesto es poner el cultivo en cuarentena y erradicación total de la planta desde la raíz. Se ha estudiado la posibilidad de atacar directamente el vector *Diaphorini citri*, y así evitar la propagación de la bacteria. Pero no asegura la eficacia de acabar con la enfermedad (ICA & CITRICALDAS, 2016).

La importancia de los controles en las diferentes enfermedades se puede realizar con medidas preventivas como el uso de plantas sanas. En algunas ocasiones es difícil encontrar árboles sanos de una sola variedad, por lo que es necesario utilizar técnicas que nos permitan obtener plantas sanas a partir de plantas enfermas. Existían dos técnicas que permitían la obtención de plantas sanas; la primera técnica es la embrionía nucelar, esta técnica se basa en los patógenos de los cítricos que no son transmitidos por las semillas y la termoterapia. Por otra parte, está la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, esta técnica estándar es descrita por Navarro (2005), la cual se usa en la mayoría de los laboratorios con el fin del mejoramiento sanitario de los cítricos, que incluye una serie de etapas como lo es la preparación del patrón, preparación del ápice, injerto, cultivo *in vitro* de las plantas injertadas y trasplante a macetas en invernadero (Navarro & Juárez, 2005).

Roca W., Mroginski L. editaron un libro llamado Cultivos de Tejidos en la Agricultura Fundamentos Aplicaciones, en este libro mencionan la importancia de la Biotecnología en el desarrollo de la agricultura y en mejorar las plantas; ellos en el capítulo 23 explican el proceso de microinjertación con los ápices meristemáticos en frutales, el procedimiento fue realizado en un

tubo de ensayo y con una exposición de luz determinada (Roca & Mroginski, 1991); los autores en este capítulo tienen en cuenta un artículo de 1975 redactado por Navarro L., Roistacher C. y Murashige T. en donde trabajaron el microinjerto para obtener cítricos libres de virus, pero usando un tipo de injerto en T invertida en el ápice decapitado, además tienen resultados muy positivos con poca luminosidad (Navarro, Roistacher, & Murashige, Improvement of Shoot-tip Grafting in vitro for Virus-free Citrus, 1975).

La Biotecnología Vegetal ofrece varias soluciones por medio de siembras *in vitro*, una de ellas es la propagación de cítricos en laboratorio por medio de microinjertos; esta técnica podría permitir que el fruto esté libre de enfermedad durante todo su crecimiento dentro del laboratorio.

Cabe señalar que la microinjertación *in vitro* de ápices caulinares es una de las mejores alternativas en la obtención de plantas de cítricos, con gran valor agronómico, obteniendo plantas libres de virus, que resulta de difícil eliminación por medio de técnicas convencionales. En este trabajo de investigación, se busca recoger información acerca de la técnica de microinjertación *in vitro* en cítricos, disminuir enfermedades como el HLB (Huanglongbing). En el laboratorio de Biotecnología Vegetal se desea estandarizar un protocolo el cuál permita la multiplicación con el uso de diversos patrones, y así obtener un producto libre de enfermedades.

En el país no se encuentran referencias de trabajos realizados utilizando la aplicación de la técnica de microinjertación, para ello se espera que esta Monografía de investigación aporte suficiente información para crear una alternativa de solución en el sector agrícola y también sea una forma de mitigación a las enfermedades y así evitar pérdidas económicas.

Para ello se formula el siguiente problema, ¿Los avances que se van adquiriendo sobre la técnica de microinjertación podrían crear una alternativa de solución para obtener semillas de cítricos libres de enfermedades en el departamento Norte de Santander?

Aunque este sea una posible alternativa de solución gratificante para los campesinos, ellos deben tener en cuenta las restricciones necesarias para evitar la propagación de enfermedades como el HLB que tiene en alerta roja no solo en Norte de Santander y La Guajira (Cárdenas, 2019), sino también a otros países productores como Argentina, un país que ya tiene presente varias maneras de evitar esta enfermedad; debido a que conocen sus efectos negativos. Inicialmente se conoce que esta enfermedad es generada por una bacteria transmitida por un insecto, luego de ser transmitida ataca directamente el sistema vascular hasta generar su muerte, pero la problemática de esta enfermedad es su efecto, ya que dura varios años en causar la muerte (Landeró, 2019).

Por lo tanto, se tiene como objetivo general: Profundizar en el conocimiento de la Técnica de Microinjección mediante CTV como herramienta para la obtención de plantas de cítricos libres de virus.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

- Profundizar en el conocimiento de la técnica de microinjertación mediante CTV como herramienta para la obtención de plantas de cítricos libres de virus.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer los elementos conceptuales relacionados con la técnica de microinjertación.
- Describir los métodos empleados en plantas de cítricos usando la Técnica de microinjertación para producir material libre de virus, vía CTV.
- Identificar los principales avances logrados con la técnica de microinjertación para producir material de cítricos libres de virus, mediante el Cultivo de Tejidos Vegetales.

2 Metodología

2.1 Método de investigación

El presente trabajo de grado se enmarca en la modalidad de monografía. El estudio se planteó desde una perspectiva de investigación documental, orientada a la indagación, recolección, organización, análisis e interpretación de fuentes documentales de información primarias y secundarias, en torno al tema de la microinjertación en cítricos como técnica de propagación para obtener material vegetal libre de virus.

2.1.1. Técnicas e instrumento de recolección y selección de información

Para la recolección de información se establecieron unos criterios previos que garantice una búsqueda confiable dirigida hacia las fuentes más relevantes

2.2 Fuentes de información y Delimitación

Se usaron bases de datos como Scielo, Google scholar, Google, entre otros. Se organizó la búsqueda de los antecedentes que hayan sido realizados en los últimos 10 o 15 años.

Los idiomas que se usaron para la búsqueda de la información fueron el español e inglés por medio de palabras claves.

Tabla 1. Palabras claves para la búsqueda de los artículos.

Descriptor Español	Descriptor Ingleses
<i>Microinjertacion</i>	<i>Micrografting</i>
<i>Microinjertación en cítricos</i>	<i>Micrografting in citrus</i>
<i>Saneamiento de cultivos de citrus</i>	<i>Citrus crop sanitation</i>
<i>Técnicas de saneamiento</i>	<i>Sanitation Techniques</i>

Se especificó el uso de documentos como:

- Artículo(s) científico (s) publicado (s) en revista por expertos.
- Tesis y trabajos de grado de pre-grado, maestría o doctorado (incluidas estancias post-doctorales) en universidades e instituciones reconocidas con declaración de revisión por expertos.

2.3 Selección y organización de la información

2.3.1 Elaboración de fichas bibliográficas

Se elaboraron 50 fichas bibliográficas de cada fuente seleccionada como pertinente y relevante.

Estas fichas contenían mínimo la siguiente información:

- Autores
- Tipo de documento
- Título del documento
- Referencia APA completa
- Resumen de información relevante

2.3.2. Organización de la información pertinente y relevante por medio de tabla con categorías iniciales

Las fichas encontradas se clasificaron de la siguiente manera:

- ❖ La microinjertación como técnica de propagación asexual en cítricos
 - El patrón o portainjerto
 - El injerto o yema injertada
 - Etapas y condiciones básicas para el establecimiento *in vitro* exitoso de un microinjertos de cítricos.
- Selección y preparación del patrón o portainjerto
- Selección y preparación del ápice o yema a injertar
- Injertación (Elección del método y ejecución del proceso)
- Desarrollo *in vitro* de las plantas injertadas

- Adaptación *ex vitro* (Trasplante a suelo)
- ❖ Métodos empleados para propagación de cítricos por microinjertación
 - Tipos, descripción y ventajas
 - Efectividad práctica alcanzada y saneamiento
- ❖ Avances prácticos en la microinjertación de cítricos

2.4 Análisis de la información

Análisis detallado de cada escrito destacando conceptos que, de información sobre el tema, metodología que nos dé aporte a nuestro proyecto para alcanzar los mejores resultados.

3 Resultados y análisis

3.1 La microinjertación como técnica de propagación asexual en cítricos

La microinjertación es una técnica de propagación que se usa principalmente para obtener plantas libres de virus, separar virus de las infecciones mezcladas, entre otras. Terrones, (2018); el microinjerto es una técnica que consiste en unir un explante con una planta patrón y así tener una propagación libre de virus. Por ello se debe tener presente la selección de dos materiales vegetales, el explante que se desea injertar y la planta patrón que servirá para realizar sobre ella el injerto obteniendo así la formación de un solo organismo.

Además, permite conseguir mayor resistencia a enfermedades, el clima, aceleración en la obtención de frutos entre otros beneficios que se obtienen a través del uso de un injerto siempre y cuando se elija el injerto adecuado o que sea compatible con el injerto que se vaya a utilizar, en ocasiones se utiliza los injertos de plantas sanas con una buena información genética para tener mayor producción. Se puede también usar una técnica de saneamiento a las plantas que se quiera realizar la propagación

3.1.1. El patrón o portainjerto

El portainjerto o patrón es una planta que tiene un sistema radicular adecuado y el cual se usa como sostén para injertar en él una yema de otra planta, para obtener una sola. Su principal función es la absorción de nutrientes y agua, permitiendo el crecimiento de una variedad determinada y tolerancia a algunas enfermedades.

El portainjerto es mayormente utilizado en frutales y es la única forma de cultivar plantas que no se logran desarrollar mediante semillas o que pueden resultar susceptibles a alguna enfermedad. Usualmente el tipo de patrón que se utiliza proviene del género *Citrus*, como lo es en el trabajo realizado por Tiribante (2018), en el que se utilizó como patrón el cítrico *Citrango troyer* y el *Citrus lambhiri* se usó como injerto, utilizó la técnica de incisión de T invertida en medio líquido MS, donde mostró que la microinjertación de ápices caulinares *in vitro* es excelente para el saneamiento de las plantas y permite obtener mayor prendimiento como fue en el caso de *Tangelo minneola* y menor presencia del virus de la tristeza el cual produce decaimiento, defoliación y clorosis en las plantas.

Los patrones algunas veces son obtenidos a partir de la germinación de semillas *in vitro* y sembrados en medio de cultivo rico en sales minerales como lo es el medio de cultivo Murashige y Skoog, además de esto existe un factor importante al momento de elegir el patrón adecuado que tiene que ver con la edad de este como es en el caso del trabajo realizado por Navarro *et al.* (2005) en el que el patrón utilizado fue *Citrango Troyer* a partir de plántulas con dos semanas de edad presentando altos porcentajes de prendimiento en comparación con el uso de plántulas de 1 semana de edad en el que los ápices se cubrían de callo en la zona de corte del patrón.

3.1.2. Injerto o yema injertada

El injerto es un tejido vegetal que se une sobre el portainjerto de forma que el conjunto de ambos crezca como un solo organismo; permitiendo así que el injerto combine las cualidades del patrón, produciendo una planta con excelentes rendimientos y alta calidad del fruto.

El injerto o yema es un órgano complejo de las plantas que se forma habitualmente en la axila de las hojas formado por un meristemo apical, normalmente se aíslan de brotes vegetativos en crecimiento de cultivos en campo o invernadero, las que se toman del campo son una fuente directa de brotes. Navarro & Juárez. (2005).

3.1.3. Etapas y condiciones básicas para el establecimiento *in vitro* exitoso de un microinjerto de cítrico

Las diferentes etapas y condiciones para el establecimiento *in vitro* de microinjertos son de gran importancia si se desea realizar microinjertación a gran escala porque se tienen en cuenta diferentes factores, entre los más importantes la contaminación donde se presenta mayor pérdida del material vegetal, como también tiene su ventaja que al controlar estos factores se logra obtener plantas libres de patógenos como fue en el caso de los autores, Vanegas & Zamora (2004) donde por medio de la aplicación de MIV (Microinjertación *in vitro*) en tejidos fue exitoso, logrando obtener plantas libres de patógenos como *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

3.1.3.1. Selección y Preparación del patrón o portainjerto

Obtención de la planta madre: en esta fase se procede a la selección de la planta madre esta debe cumplir con unos niveles estándares mínimos los cuales son que no tenga ninguna enfermedad causada por ningún macro o microorganismo, que su nivel de producción sea aceptable. Si en la planta madre llega a presentar enfermedades leves se podría manejar con un protocolo de desinfección o controlando por medios de los medios de cultivos.

El uso de los portainjertos en frutales ha sido una herramienta muy utilizada por el hombre ya que con ella se ha logrado un incremento en el rendimiento y calidad de las diferentes especies de plantas a obtener por medio de microinjertación *in vitro* de cítricos, como es en el caso del trabajo realizado por Hernández *et al.*, (2006) donde se usó plantas cítricas que tenía el virus de la tristeza la técnica de patrón logra poder controlar los diferentes contaminantes que venga desde la planta madre para obtener una planta sana y que su producción no se vea afectada por dichos contaminantes.

Desinfección del material vegetal: en esta etapa se procede a desinfectar el material obtenido de la planta madre los cuales pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas para eliminar contaminantes externos o internos, en el caso de que se requiera una eliminación de patógenos se procederá a realizar un protocolo más adecuado para tratar este patógeno y no altere al material.

Los Patrones son muy sensibles a contaminantes si no se manejan adecuadamente como lo comprobó, Cortés (2004) en su investigación demostró que un periodo muy largo entre el material obtenido de la planta madre, el periodo de desinfección y la manipulación de varias personas logró que los agentes patógenos se propagaran y dañaran los patrones. Para evitar estos problemas se procedió a controlar cada factor para así mantener un mayor equilibrio y así obtener el mayor número de patrones aptos posibles.

3.1.3.2. Selección y Preparación del ápice o yema a injertar

Para la selección y preparación de la yema a injertar se tuvo en cuenta el trabajo realizado por Barreras. (1990), él obtuvo las yemas por medio de crecimientos vegetativos, y se desfoliaron a mano para producir brotación en 10 a 20 días; generalmente las yemas se consiguen en

invernaderos porque estas plantas no sufren por las estaciones del año, específicamente las yemas son obtenidas en nuevos brotes en crecimiento activo en invernadero o campo, yemas axilares y de brotaciones de yemas axilares *in vitro*. Una vez las yemas estén seleccionadas deben ser desinfectadas para proceder a la aplicación del microinjerto junto con el patrón.

Es posible encontrar en las plantaciones árboles con buenas características hortícolas que no presenten enfermedades lo cual requiere ser corroborado mediante diagnóstico con las pruebas adecuadas y considerar entonces la factibilidad de tomarlos como fuente de material de propagación, esta técnica constituye en la actualidad la vía por excelencia para disponer del material de propagación certificado que se lleva a las plantaciones comerciales, garantizar el estado sanitario de las accesiones de un banco de germoplasma de cítricos para su utilización en los programas de mejoramiento genético y conservar adecuadamente estos valiosos recursos fitogenéticos. Camacho, (2008) utilizó brotes de entre 2 y 3 cm para evitar ápices degenerados o en estado de abscisión. A cada brote se le eliminan las hojas mayores y se separa la parte terminal con una longitud de 1 cm. Posteriormente se realiza la esterilización de superficie por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,25% más 0,1% de Tween 20 durante cinco minutos y se enjuaga repetidas veces con agua destilada estéril. Y demostrado ser la vía más eficaz para obtener material de propagación vegetativo libre de patógenos, debido a que con su utilización se pueden eliminar aquellos para los que no resulta eficaz la termoterapia. Además, las plantas obtenidas a través de microinjerto muestran características morfológicas idénticas a las de los árboles de origen

3.1.3.3. Injertación (Elección del método y ejecución del proceso)

Los tipos de injerto son muy sencillos y aún más los microinjertos *in vitro*, pero partiendo de esa unión de patrón con el ápice, se desarrollaron varias técnicas como se propone en los autores

de esta investigación, ellos realizaron dos tipos de corte para unir el explante con el patrón, uno de los cortes es Horizontal, este corte consiste en tomar el explante y realizar un corte horizontal al nivel de los cotiledones eliminando así el ápice de la plántula, y colocando en el corte un ápice de 0.5 cm que proviene de un brote que fue multiplicado *in vitro*; por otra parte el corte en V, tiene el mismo proceso que el anterior pero tiene la característica de realizar el corte en forma de V en la plántula a la altura de los cotiledones. Nava *et al.* (2011).

Además de esos dos cortes también se puede agregar uno que ha sido efectivo, el corte se conoce como T invertida o Miniescudete; para realizar el microinjerto, se tomaron las plántulas del patrón para cortarlo dejando 4-5 cm aproximadamente del epicótilo, se quitaron la raíz primaria pero fue cortada dejando 2-3 cm, en el momento de comenzar la incisión T invertida se realizó con dimensiones de 1 mm en el extremo del epicótilo decapitado y un corte horizontal de 1-2 mm de ancho a través de la corteza sin dañar la médula, el injerto se posiciona sobre el patrón y al unir los dos hacen la forma de una T invertida por el acople exacto (Terrones 2018).

El corte en forma de una cuña es el mismo corte en V, pero prefieren denominarlo así; consiste en tomar el ápice caulinar aséptico sin hojas, en la parte basal realizar dos cortes oblicuos convergentes para formar la cuña, para el portainjerto se eliminaron las yemas axilares y el callo basal, se decapitan y se corta acorde con el tamaño de la cuña. A teniendo la cuña se procede a ensamblar y sujetarse con anillos de silicona Maldonado *et al.*, (2008).

3.1.3.4.Desarrollo *in vitro* de las plantas injertadas

Introducción del material *in vitro*: una vez termine la fase de desinfección se procede a una siembra en medios de cultivos los cuales en sus componentes tienen reguladores que evita el crecimiento de bacterias u hongos. En estos medios unos de los componentes son las citoquininas

su función es la generación de nuevos brotes mediante el aumento de la división celular en esta primera etapa se conoce como adaptación que es que los explantes se adapten al medio de cultivo.

Una buena microinjertación debe empezar por un excelente protocolo de desinfección ya que es la eliminación de agentes patógenos que perjudique los explantes, también los medios de cultivos son importantes en algunos cultivos se utiliza agentes bacterianos y fúngicos para evitar el crecimiento de bacterias y hongos. (Campos *et al.*, (2020), en sus experimentos diseñó y evaluó un protocolo de desinfección para su microinjertación, el cual consistió en someter los explantes en Hipoclorito al 3% + 3 gotas de Tween 80, pero con tiempos de 10-15-20 min; las semillas se desinfectaron con alcohol al 70% (30 seg), Hipoclorito 0.5% por 10 min y 20 min. En los resultados se observó que los protocolos de desinfección funcionan para mitigar la contaminación del material vegetal, pero se puede concluir que cuando son sometidos durante mucho tiempo pueden generar problemas en la germinación.

Mientras que los autores (Castro & Flores., 2007)) evaluaron la efectividad de dos medios de cultivos uno líquido y otro semisólido, logrando excelentes resultados en la microinjertación, presentando excelente crecimiento y brotación.

Así mismo, debemos tener en cuenta que, para poder adquirir una producción con todos los estándares de calidad, debe haber control sobre agentes externos como microorganismos, además de la contaminación que puede estar presente sobre los materiales y el laboratorio; la mejor manera de mitigar estos factores que pueden afectar toda la producción son los protocolos de desinfección sobre el material vegetal. El protocolo de desinfección requiere al menos un agente desinfectante; el siguiente artículo realiza el protocolo más usado, pero implementaron un protocolo de desinfección para las semillas y para las varetas; las semillas se dejaron en Hipoclorito Sódico al 10% y 1% de Tween 20 por 10 min, después de eso fueron enjuagadas 3 veces con agua estéril.

Por otra parte, las varetas se sometieron a una lavada con agua corriente y así ser lavadas con etanol al 95% y desinfectadas con Hipoclorito al 5% por 10 min, y para terminar se lava con agua estéril. Cabe aclarar que durante la aplicación del agente desinfectante normalmente se hace en una cámara de flujo laminar para disminuir la contaminación de agentes externos. (Godoy *et al.* 2013).

Las propiedades que pueden cambiar son las concentraciones y los tiempos con los agentes desinfectantes y los diferentes alcoholes como sucede en los siguientes trabajos. En el primero las semillas fueron desinfectadas con 0.5% por 10 min y se enjuagaron en tres repeticiones con agua destilada estéril. Y los ápices meristemáticos se lavaron con mucha agua corriente para eliminar restos de polvos, después se dejó en alcohol al 70% por 15 seg, y por último se deja en Hipoclorito de Sodio al 2.5% con 3 gotas de Woolite (un detergente); se puede observar que acá no usaron el Tween sino un detergente en el protocolo de desinfección (Coloma, 2018). Y en este otro caso se tomaron de a 10 semillas envueltas en trozos de gasa y así se introducen en tubos de ensayo con alcohol al 70% por 1 min, y luego se colocaron en Hipoclorito de sodio al 4% añadiéndole 0.1% de Tween 20 por 5 minutos, finalizando con una jugada con agua destilada estéril en tres repeticiones; las varetas solo se desinfectaron con Hipoclorito al 10%. (Terrones 2018).

Multiplicación de los brotes: En esta fase se selecciona los explantes que hayan sobrevivido a las etapas anteriores, a estos explantes se llevan a otros medios de cultivos para su crecimiento y seguir controlando agentes patógenos.

Enraizamiento de los explantes: en esta etapa se procede a trasladar los explantes que hayan sobrevivido a otro medio de cultivo que esté enriquecido por auxinas y disminuyendo las citoquininas para que así se estimule la producción de raíz.

Las auxinas son hormonas vegetales naturales encargadas de regular diferentes aspectos de los explantes como el desarrollo y crecimiento de estas, como también en los agricultores los cuales las usan para acelerar el crecimiento de las plantas, promover la iniciación de raíces y evitar la caída prematura de los frutos, Coloma (2018) donde evaluó la efectividad de las auxinas en la microinjertación usando meristemos de plantas cítricas las cuales su efectividad en algunas auxinas fueron de un 92% en plantas de limonero y un 96% en naranjo lo cual demostró que las auxinas juegan un papel importante en la microinjertación.

3.1.3.5. Adaptación *ex vitro* (Trasplante a suelo)

Adaptación o a climatización de los explantes: en esta fase los explantes se procede a trasplantarse en pequeñas bolsas y llevada a un invernadero para empezar a controlar y a climatizarla por un periodo de unos 2 meses.

Trasplante: en esta fase final las plantas que hayan sobrevivido a la climatización se procede a trasplantar la planta para que continúe su ciclo de vida.

3.2 Métodos empleados para microinjertación en cítricos.

Las técnicas de microinjertación en la actualidad han sido utilizadas para la revigorización de material vegetal que presente problemas de propagación *in vitro* de plantas y producción de estas libres de virus, obteniendo material vegetal resistente a plagas o enfermedades presentadas en los diferentes cultivos de cítricos.

Existen diferentes técnicas de microinjertación como por ejemplo lo es la técnica de microinjertación seriada la cual es la más usada para la eliminación de explantes que presenten contaminación y supervivencia de los explantes más resistentes, aunque se logra con la intervención de los medios de cultivo que aportan los nutrientes esenciales a los diferentes explantes, como es en el caso del trabajo realizado por (Acosta *et al.* (2011) en el cual por medio

de la técnica de microinjertación seriada se obtuvo un alto porcentaje de explantes con brotes indicando la eficiencia de esta técnica.

Anteriormente se mencionaron varias técnicas, a continuación, se ordenarán todas las diferentes técnicas en una tabla, esta tabla estará compuesta del título, método y el autor que utilizó el mejor método para el desarrollo de su investigación.

Tabla 2. Metodos de Microinjertacion.

Método de Microinjertación	Título	Autor
T Invertida	Influencia de sacarosa y cotiledones en la microinjertación de cítricos	(Lihua Quispe, Calderón Rodríguez, & Cabrera Pintado, Influencia de Sacarosa y Cotiledones en la Microinjertación de Cítricos, 2019)
	Efecto de la Sacarosa y Cotiledones Sobre el Prendimiento de Microinjertos <i>in vitro</i> de Naranja y Limón (<i>Citrus sp.</i>)	(Lihua Quispe, Efecto de la Sacarosa y Cotiledones sobre el prendimiento de Microinjertos <i>in vitro</i> de Naranja y Limón (<i>Citrus sp.</i>), 2018)
	Microinjerto de ápices caulinares <i>in vitro</i> para saneamiento de "virus de la tristeza de cítricos" (CTV) en Tangelo minneola	(Tirabante Terrones, 2018)

	"tangelo" y Citrus limón variedad eureka "limón"	
	Obtención de plantas de naranjo dulce Citrus sinensis (L.) Osbeck V. Folha murcha, libres del virus de la psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares <i>in vitro</i>	(Mendoza Godoy, Villalba Romero, & González Segnana, 2013)
	Adaptación de la técnica de Microinjertación <i>in vitro</i> de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (<i>Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck</i>) y Citrumelo (<i>Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus paradisi Macf.</i>)	(Cortés Paniagua, 2004)
	Cuatro modalidades de Microinjerto tres Auxinas (Ana, Aia, Aib) en el manejo <i>In Vitro</i> de Plantas de Limonero (<i>Citrus aurantifolia Christm.</i>) y Naranjo (<i>Citrus sinensis L.</i>)	(Coloma, 2018)
	Estudios <i>in vitro</i> sobre la técnica de microinjerto en dos cultivares de cítricos para producir plantas libres de virus"	(Naz A. , Jaskani, Research, & Qasim, 2007)
	Evaluación de la Eficacia de los Métodos de Mini Injertos Hendidura, T Invertida y	

	Yema Terminal en la Propagación de Plantas de Naranja Valencia (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.)	(Álvarez Correa, 2020)
	Ensayo de la técnica de microinjertación de yemas de naranjo dulce <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck en micropatrones de naranjo agrio <i>Citrus aurantium</i> L.	(Barreras Valdez & Meza Valenzuela, 1990)
	Improvement of Shoot-tip Grafting <i>in vitro</i> for Virus-free Citrus	(Navarro, Roistacher, & Murashige, 1975)
Corte en V	Reactivación de material vegetal élite de <i>Pinus radiata</i> d. Don. Mediante microinjerto <i>in vitro</i> . Interciencia.	(Materán, Vega, Sánchez Olate, Sáez, Rodríguez, & Ríos, 2008)
Corte Triangular	Uso del microinjerto <i>in vitro</i> de ápices caulinares para eliminar ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ' en cultivares de cítricos en Cuba	(Zamora Rodríguez, Luís Pantoja, Peña Bázaga, Ferriol Marchena, & Hernández Rodríguez, 2015)
	Cuatro modalidades de Microinjerto tres Auxinas (Ana, Aia, Aib) en el manejo <i>In Vitro</i> de Plantas de Limonero (<i>Citrus</i>	(Coloma, 2018)

Hendidura	<i>aurantifolia</i> Christm.) y Naranja (<i>Citrus sinensis</i> L.)	
	Evaluación de la Eficacia de los Métodos de Mini Injertos Hendidura, T Invertida y Yema Terminal en la Propagación de Plantas de Naranja Valencia (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.)	(Álvarez Correa, 2020)
Escisión T Normal	Cuatro modalidades de Microinjerto tres Auxinas (Ana, Aia, Aib) en el manejo <i>In Vitro</i> de Plantas de Limonero (<i>Citrus aurantifolia</i> Christm.) y Naranja (<i>Citrus sinensis</i> L.)	(Coloma, 2018)
Colocación de Superficie	Estudios <i>in vitro</i> sobre la técnica de microinjerto en dos cultivares de cítricos para producir plantas libres de virus"	(Naz A. , Jaskani, Research, & Qasim, 2007)
	Ensayo de la técnica de microinjertación de yemas de naranja dulce <i>citrus sinensis</i> L. Osbeck en micropatrones de naranja agrio <i>citrus aurantium</i> l.	(Barreras Valdez & Meza Valenzuela, 1990)
Mini Injerto	Evaluación de la Eficacia de los Métodos de Mini Injertos Hendidura, T Invertida y Yema Terminal en la Propagación de	(Álvarez Correa, 2020)

Mini Injerto Yema Terminal	Plantas de Naranja Valencia (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.)	
Corte en forma de Triángulo	Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México	(Varela González, 2015)

3.2.1 Tipos, descripción y ventajas

En los tipos de técnicas de microinjertación en cítricos, existe la técnica de saneamiento la cual permite la eliminación de patógenos presentes en plantas madres, la técnica de saneamiento más usada es la técnica MIV (microinjertación *in vitro* de ápices caulinares) en la eliminación de las diferentes bacterias que atacan cultivos de cítricos como lo es *Candidatus Liberibacter asiaticus* y por medio de esta técnica se ha comprobado su eficiencia con una eliminación de 100% del material vegetal, manteniendo las plantas libres de esta bacteria por largo tiempo, demostrando por cuatro años su efectividad en saneamiento vegetal. (Zamora *et al.* (2015).

Como también existe la técnica de termoterapia en la cual consiste en usar choques térmicos en la temperatura para provocar un estrés, con el fin de eliminar los agentes patógenos que causan la enfermedad en la planta como lo hizo (Godoy *et al.* (2013), donde se realizó la combinación de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares, permitiendo obtener plantas libres de sorosis la enfermedad que estaba causando daño en *Citrus sinensis*.

Aunque existen otras técnicas de injertación, pero la que más se utiliza en diferentes investigaciones de cítricos es la T invertida, la cual consiste en realizar microinjertos sobre patrones que se le realizan el corte en forma de T invertida como su nombre lo dice, permitiendo

obtener plantas con frutos de calidad y tolerante a ciertas condiciones del suelo adversos al crecimiento, aunque los resultados no son los mejores pero sus porcentajes son aceptables como lo realizó (Naz *et al.* (2007) que combinó la técnica de T invertida con la colocación en superficie donde su efectividad en la microinjertación fue inferior al 40%.

De igual manera observando la tabla de técnicas o métodos de microinjertación se puede concluir que el método de T Invertida demostró ser un método bastante eficaz en microinjertación *in vitro*, la razón es probablemente por su facilidad a la hora de realizar el corte y también porque el explante tiende a estar mejor acoplado al patrón, y así obtener el microinjerto deseado. Una demostración de su eficacia se puede observar en los resultados de la investigación de (Correa (2020), él usa varias técnicas de microinjerto y al final en los resultados demostró que la T Invertida es una técnica que obtiene mayor porcentaje de supervivencia, después de la técnica de Hendidura que obtuvo un 75% de éxito.

3.3 Avances prácticos en la microinjertación de cítricos

La microinjertación demuestra ser una técnica de propagación *in vitro* que permite la obtención de material libre de virus, su procedimiento es sencillo. (Navarro *et al.*, (1975), ellos propusieron en su investigación el método de T invertida para realizar la microinjertación *in vitro* en Cítricos, las plantas microinjertadas fueron sometidas a unas condiciones lumínicas de 16h con 1000 lux, hubo una frecuencia de 30 a 50% de injertos usando plántulas de crecimiento oscuro de 2 semanas como portainjertos y usando puntas de los brotes de 0.14 a 0.18 mm de largo como vástago. Por otra parte, (Barrera & Meza (1990)) realizaron la misma técnica de T invertida mencionada anteriormente, y las mismas condiciones de luz por 16h en yemas *Citrus sinensis L. Osbeck* utilizando como patrón *Citrus x aurantium*; la técnica demuestra ser eficaz, pero los mejores resultados se obtuvieron en plantas con tres semanas germinadas en la oscuridad. Se puede decir

que la T invertida es la técnica de microinjertación más usada, además es una técnica muy eficiente; sin embargo, la técnica de T invertida fue probada para saneamiento de HLB, como lo propusieron (Zamora *et al.* (2015) ellos aplicaron la técnica de Microinjerto *in vitro* de semillas de *Citrus macrophulla* como patrón y para los injertos se usaron *Citrus sinensis L.* y *Poncirus trifoliata L.*, las plantas injertadas se introdujeron en un tubo con medio líquido MS y sustancias orgánicas, estas se mantuvieron en el cuarto de cultivo por 5-7 semanas, luego las plantas microinjertadas se reinjertaaron en patrones de *Citrango* carrizo para acelerar el desarrollo y realizar aclimatación; en los resultados el 100% de las plantas obtenidas estuvieron libres del virus por cuatro años.

Se debe tener en cuenta que el material vegetal a veces proviene de campos donde existe gran contaminación, los protocolos cumplen una función totalmente necesaria, pero primero debemos investigar cuál podría ser el más eficiente, porque esto evita problemas sobre la producción que se desea obtener; uno de ellos es que no permite pérdidas económicas.

El agente desinfectante más eficaz y más utilizado en todos los protocolos es el Hipoclorito de Sodio, pero se debe tener en cuenta la concentración y el tiempo que se dejará el material vegetal. (Varela (2015) realizó varias concentraciones en diferentes tiempos; mostró buenos resultados porque no hubo presencia de contaminación externa, el mejor resultado fue usar el Hipoclorito al 5% con 3 gotas de Tween 20 por 10 min; pero recomienda no dejar por mucho tiempo el material vegetal inmerso en el Hipoclorito, porque puede generar muerte sobre el material vegetal.

(Cortés (2004) propuso para los explantes un tratamiento con 0.25% con 0.1% de Tween durante 5 minutos, en los patrones el tratamiento con 0.8% por 8 minutos permitió obtener mayor propagación de estos. Para terminar, se analiza en los siguientes artículos que los autores realizaron

una tabla con varios tratamientos, pero las tablas poseen las mismas concentraciones y tiempos; (Quispe (2018) y Cabrera *et al.* (2019) presentaron sus protocolos de la siguiente manera.

Realizaron unos tratamientos para varetas y para semillas, cada una con 4 tratamientos y en cada tratamiento. Primero en las semillas se usaron 30 unidades experimentales en cada tratamiento, el primer tratamiento tenía una concentración de 0.08% de NaClO por 5 min, el segundo 0.16%, el tercero 0.2% y el cuarto tenía una concentración de 0.8% todos estos tres por 10 min; y por otra parte con las varetas se usaron 20 unidades experimentales en cada tratamiento con diferentes concentraciones, la primera tenía una concentración de 0.70% de NaClO por 10 min, los otros tenían una concentración de 0.88%, 1% y 1.5% respectivamente por un tiempo de 20 min.

Pero (Quispe (2018) tiene en cuenta un testigo para las semillas y un testigo para las varetas; 30 varetas sirvieron de testigo y se dejaron con 0.16% de Hipoclorito por 5 minutos, y para las semillas se usaron 20 unidades con un porcentaje de 0.88% de Hipoclorito por 10 minutos. En los resultados de las dos investigaciones, se demostró que en las semillas es más eficaz el Tratamiento con 0.16% de Hipoclorito por 5 minutos, que fue el tratamiento del testigo; por otra parte, el mejor tratamiento fue con un porcentaje de 1% por 20 minutos. Se debe tener en cuenta que el tratamiento más eficiente no es solamente el que tiene menor contaminación, sino también el que permite el proceso de germinación de la planta, pues los tratamientos con mayor porcentaje no permiten que haya contaminación, pero logra deteriorar el material vegetal.

Cabe agregar que Liz Lihua desarrolló su tesis usando como patrón las semillas de *Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*, ella realizó un tratamiento de inmersión en agua a 52°C y con hidroxiquinolina para eliminar presencia de bacterias y hongos en las semillas. Asimismo, usaron

meristemas de varetas extraídas de plantas madres de *Citrus sinensis* variedad *Washington Navel* y *Citrus* limón variedad *Eureka*.

Por otra parte, los medios de cultivos y sus componentes son importantes para lograr que los explantes cumplan con sus necesidades y obtener su crecimiento. Autores como (Arrieta *et al.* (2005) y (Vidal & Marco (2014)) donde se establecieron microinjertos in vitro por medio de segmentos nodales en medio de cultivo MS y suplementado con ANA, en el caso de Vidal utilizo reguladores de crecimiento y adición de PPM(Plant Preservative Mixture) que es un regulador de agentes patógenos y KIN, Arrieta logró mayor enraizamiento y brote con ANA lo que permitió un crecimiento significativo de la raíz y mayor número de nudos, en cambio Vidal alcanzó solo el 34% de explantes con brotes.

El Medio de Cultivo MS es comúnmente usado para siembras in vitro, estas van acompañados por vitaminas, Sacarosa y otros compuestos que permiten el crecimiento del material vegetal, y además compuestos que inhiben contaminación generado por muchos factores; (Mendoza *et al.* (2013) realizó un procedimiento que consistía primero en someter el material vegetal a termoterapia así proceder al microinjerto sobre el medio de cultivo con 70 g/L de Sacarosa, inositol, clorhidrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina y ácido nicotínico para obtener Naranja dulce libre de virus. Por otra parte, Cabrera *et al.* (2019) preparó el MS con vitaminas White y Sacarosa en dos concentraciones diferentes e identificar que influencia tiene sobre la siembra, y ellos observaron que la Sacarosa en bajas concentraciones forman Xilema, y cuando existe una alta concentración se forma el Floema, por ello recomiendan usar concentraciones entre 25-30 g/L y así formar Xilema y Floema.

Las investigaciones cada vez van avanzando y por eso se comienzan a buscar otras alternativas que permitan la supervivencia de las plantas cuando son llevadas al proceso de aclimatación, pues los agares y el papel filtro han demostrado que al momento de ser transferidos al campo no demuestran eficacia al 100%, pues tienden a no sobrevivir; por esta razón en esta investigación tienen como objetivo usar sustratos inertes y observar la multiplicación, enraizamiento y la supervivencia de los Cítricos que ellos utilizaron; los sustratos inertes fueron, 1) Agrolita, 2) Vermiculita y 3) Tezontle; se llevaron a un proceso de tamizaje y esterilización para así ser agregados junto con el medio de cultivo MS. En los resultados ellos obtuvieron resultados muy positivos en la Germinación, Crecimiento y Enraizamiento, entonces concluyeron que si se pueden usar diferentes Sustratos Inertes como alternativa para que haya una mayor supervivencia de las plantas al ser llevadas a la aclimatación (Hernández *et al.*, (2006).

Para finalizar, algunas técnicas *ex vitro* se pueden aplicar en laboratorio, como (Correa (2020) que planteó evaluar diferentes técnicas de mini injertos *ex vitro*; las técnicas son mini injertos Hendidura, T invertida y Yema terminal, en las pruebas se quería producir naranja valenciana y tomaron como patrón las semillas de la mandarina cleopatra (*Citrus reshni Hort ex Tan*), estos mini injertos fueron dejados en una casa malla y recibían riego por medio de aspersión; en los resultados se observó que la Hendidura demostró un mejor desempeño con un porcentaje de 75% de éxito en sus mini injertos. Cabe tener en cuenta un dato muy importante en el momento de producir el patrón, pues el autor realizó una escarificación en algunas semillas, estas semillas tuvieron un 100% de germinación, lo cual puede tenerse en cuenta para la producción de patrones que sean necesarios en la aplicación de microinjertos.

4 Conclusiones

- En la investigación de microinjertación *in vitro* de cítricos se logró identificar las técnicas más usadas de microinjertación para producir plantas libres de virus las cuales son la técnica de T invertida demostrando que es excelente para el saneamiento de las plantas evitando contaminación en cultivos de cítricos.
- En las etapas de la microinjertación *in vitro* en cítricos, se tiene en cuenta distintos elementos, entre los cuales se encuentra el medio de cultivo que aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del explante. En el desarrollo de este documento, el medio de cultivo que mostró unos resultados más óptimos, fue a través de la implantación del medio MS debido a su composición nutritiva.
- Como se ve reflejada en las distintas investigaciones consultadas, se tiene en cuenta el tipo de patrón e injerto a utilizar, en el caso del patrón se elige prudentemente debido a que este debe estar libre de factores contaminantes, entre los más usados se encuentran *Citrang troyer* y *Citrus lambhiri*.
- Algunas técnicas de injertos que normalmente son desarrolladas en campo o invernadero, también pueden ser utilizadas para aplicarlas en laboratorio; además el uso de semillas escarificadas para la propagación de patrones demuestra ser una excelente técnica.
- El uso de sustratos inertes como alternativa en la microinjertación *in vitro* permite mayor sobrevivencia al momento de ser aclimatadas.

5 Bibliografía

- Acosta, A., Peña, E., & Castro, D. (2011). Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de *Annona muricata* mediante la técnica de microinjertación seriada. *Acta Agronómica*, 60(2), 140-146.
- Álvarez Correa, C. (2020). *Evaluación de la Eficacia de los Métodos de Mini Injertos Hendidura, T Invertida y Yema Terminal en la Propagación de Plantas de Naranja Valencia (Citrus sinensis (L.) Osbeck.)*. 78 p. Montería: Universidad de Córdoba.
- Angarita Vanegas, H., Zamora Montoya, L. A., Sánchez, J. (2004). Microinjertación in vitro en cítricos a escala comercial en el valle del Cauca. *Fitotecnia Colombiana*, 81-84.
- Arévalo, P. A., Parra Coronado, A., & Orduz Rodríguez, J. O. (2016). Caracterización fisicoquímica en poscosecha de diferentes materiales de lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) para exportación. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 241-251. <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5749>
- Barreras Valdez, S., & Meza Valenzuela, J. (1990). *Ensayo de las técnicas de microinjertación de yemas de naranjo dulce citrus sinensis L. Osbeck en micropatrones de naranjo agrio citrus aurantium l.* México: Universidad de Sonora. <http://hdl.handle.net/20.500.12984/2643>.
- Campos Ruiz, J., Arteaga Cuba, M., Campos Ruiz, S., Chico Ruíz, J., & Cerna Rebaza, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156.
- Cárdenas, J. (16 de 06 de 2019). Cómo prevenir en sus cultivos de cítricos el dragón asiático. (L. Rodríguez, Entrevistador). Caracol Radio. https://caracol.com.co/programa/2019/06/15/al_campo/1560618693_285384.html

- Castro Caicedo, B. L., Timmer, L., Leguizamón Caycedo, J. E., Walter Müller, G., & Corrales Giraldo, J. A. (2000). *Enfermedades de los Cítricos en Colombia*. Bogotá: Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola. <https://docplayer.es/27361414-Enfermedades-de-los-citricos-en-colombia.html>
- Coloma, F. (2018). *Cuatro modalidades de Microinjerto tres Auxinas (Ana, Aia, Aib) en el manejo In Vitro de Plantas de Limonero (Citrus aurantifolia Christm.) y Naranja (Citrus sinensis L.)*. *Veritas*, 18(1), 97-105. <https://revistas.ucsm.edu.pe/ojs/index.php/veritas/article/view/158>
- Cortés Paniagua, R. (2004). *Adaptación de la técnica de Microinjertación in vitro de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck) y Citrumelo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus paradisi M.* Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Cruz Mamani, A. L., Mercado, L. R., & Romero, M. M. (2020) Establecimiento in vitro del portainjerto de Durazno gxn (Garfield- Nemared), con brotes de verano, en laboratorio de cultivos in vitro. *Ventana Científica Estudiantil*. 38-42.
- Espinosa Orrego, J. A., Trillos González, O., Hoyos Sánchez, R. A., Afanador Kafuri, L., & Correa Londoño, G. (2005). Potencial de Propagación in vitro para el Tomate de Árbol Partenocárpico *Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. Vol. 58, No. 1. 2685-2695.
- ICA, & CITRICALDAS. (2016). *Alerta Naranja*. Colombia.
- Jaramillo, L. Á. S., Martínez Jaime, O. A., & Elías Román, R. DD. (2018). Propagación y establecimiento de variedades de durazno, ciruelo y chabacano. Vol. 58. *Jóvenes en la Ciencia*. 119-124.

- Jones Castro, F. & Flores Mora, D. M. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Revista Tecnología en Marcha*, 20(3). Pág. 46. Recuperado de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/99
- Landero, J. (16 de 11 de 2019). Temor por la cercanía a 200 kilómetros de Huelva del insecto que transmite la plaga más devastadora en cítricos. *HuelvaCosta*. Tomada de <https://huelvacosta.com/temor-por-la-cercania-a-200-kilometros-de-huelva-del-insecto-que-transmite-la-plaga-mas-devastadora-en-citricos/>
- Lihua Quispe, L. (2018). *Efecto de la Sacarosa y Cotiledones sobre el prendimiento de Microinjertos in vitro de Naranja y Limón (Citrus sp.)*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Lihua Quispe, L. J., Calderón Rodríguez, A. C., & Cabrera Pintado, R. M. (2019). Influencia de sacarosa y cotiledones en la microinjertación de cítricos. *Ecuadores Calidad*, 23-36.
- Martínez Hernández, M., López, A., Osorio Acosta, F., Gallardo López, F., López Moctezuma, H., & Mata Rosas, M. (2006). Cultivo in vitro de Patrones de Cítricos Tolerantes al Virus de la Tristeza, empleando Sustratos Inertes Alternativos al Agar. *Interciencia*, 616-619.
- Materán, M., Vega, M., Sánchez Olate, M., Sáez, K., Rodríguez, R., & Ríos, D. (2008). Reactivación de material vegetal élite de *Pinus radiata* d. Don. Mediante microinjerto in vitro. *Interciencia*, 66-70.
- Mendoza Godoy, G., Villalba Romero, N., & González Segnana, L. (2013). Obtención de plantas de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck V. Folha murcha, libres del virus de la psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares in vitro. *Investigación Agraria*, 15-19.

- Ministerio de Agricultura. (2019). *Cadena del cítricos Indicadores e instrumentos*. Colombia
- Muñoz, P., San Pedro, T., Martínez, N., & Gisbert, C. (2015). Conservación in vitro de germoplasma de vid. In *XI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in Vitro de Tejidos Vegetales: 3 y 4 septiembre de 2015 Fundación Universidad Empresa de Valencia-Adeit Plaza Virgen de la Paz*, Fundación Universidad Empresa de Valencia.
- Nava, R., Vegas García, A., Marín R, C., & Villegas, Z. (2011). Propagación clonal de plantas Élite de *Carica papaya* L. usando microinjertación in vitro e in vivo. *Interciencia*, 517-523.
- Navarro, L., Roistacher, C., & Murashige, T. (1975). Improvement of Shoot-tip Grafting in vitro for Virus-free Citrus. *Journal of the American Society for Hortivultura Science*, 471-479.
- Navarro, L., & Juárez, J. (2005). *Phytoma*. Obtenido de Microinjerto de ápices caulinares de cítricos in vitro: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/170-junio-julio-2005/microinjerto-de-pices-caulinares-de-ctricos-in-vitro>
- Naz, A., Jaskani, M., Research, A., & Qasim, A. (2007). In vitro studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. *Pakistan Journal of Botany*, 1773-1778.
- Arrieta Padilla, E. P., & Rico Herrera, H. E. (2005). Producción de plántulas de Limón Criollo (*Citrus aurantifolia*) mediante la técnica de micropropagación in vitro. *Universidad de Sucre*.
- Rache Cardenal, L., Rojas Pinzón, E., & Pacheco Maldonado, J. (2008). Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento in vitro de microinjertos. *Bioagro*, 57-65.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. *CIAT*.

- Rojas Sandoval, K. J., & Vargas, K. (07 de 03 de 2016). La Agricultura colombiana en el contexto de la globalización. *el campesino.co*.
- Rodríguez, N. N., Capote, M., & Zamora, V. (1999). Cultivo in vitro del aguacatero (*Persea americana* Mill). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 231-237
- Santiana, V., & Wilson, R. (2014). Establecimiento in vitro de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares.
- Tirabante Terrones, N. (2018). *Microinjerto de ápices caulinares in vitro para saneamiento de "virus de la tristeza de cítricos" (CTV) en Tangelo minneola "tangelo" y Citrus limón variedad eureka "limón"*. Piura: Universidad Nacional de Piura.
- Varela González, F. (2015). *Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México*. México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Vega, J. P. (29 de 05 de 2018). La exportación de cítricos a EE.UU. comenzará en 2019. *LA REPUBLICA*.
- Vidal Rivera, M. V. (11 de 2015). Propagación in vitro de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales. Zamorano, Honduras.
- Zamora Rodríguez, V., Luís Pantoja, M., Peña Bárzaga, I., Ferriol Marchena, X., & Hernández Rodríguez, L. (2015). Uso del microinjerto in vitro de ápices caulinares para eliminar 'Candidatus Liberibacter asiaticus' en cultivares de cítricos en Cuba. *Protección Vegetal*, 123-132.

6 ANEXOS

Tabla 3. Fichas Bibliográficas.

Título	Referencia
<p>Influencia de sacarosa y cotiledones en la microinjertación de cítricos</p>	<p>Quispe, Liz & Rodríguez, Abelardo & Cabrera Pintado, Rosa. (2019). INFLUENCIA DE SACAROSA Y COTILEDONES EN LA MICROINJERTACIÓN DE CÍTRICOS. ECUADOR ES CALIDAD - Revista Científica Ecuatoriana. 6. 10.36331/revista.v6i1.62.</p>
<p>Propagación clonal de plantas élite de <i>carica papaya</i> l. Usando microinjertación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></p>	<p>Nava, Rutsarai y Vegas García, Ariadne y Marín R., Carlos y Villegas, Zaith (2011). Propagación clonal de plantas Élite de Carica papaya L. usando microinjertación in vitro e in vivo. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=339/33919424007</p>
<p>Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de <i>Annona muricata</i> mediante la técnica de microinjertación seriada</p>	<p>Rangel, A. M. A., Salamanca, E. J. P., & Restrepo, D. C. (2011). Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de <i>Annona muricata</i> mediante la técnica de</p>

	microinjertación seriada. <i>Acta Agronómica</i> , 60(2), 140-146.
Uso del microinjerto in vitro de ápices caulinares para eliminar 'Candidatus Liberibacter asiaticus' en cultivares de cítricos en Cuba	Zamora-Rodríguez, V., Luís-Pantoja, M., Peña-Bárcaga, I., Ferriol-Marchena, X., & Hernández-Rodríguez, L. (2015). Uso del microinjerto in vitro de ápices caulinares para eliminar 'Candidatus Liberibacter asiaticus' en cultivares de cítricos en Cuba. <i>Revista de Protección Vegetal</i> , 30(2), 123-132.
Cultivo in vitro del aguacatero (persea americana mill.)	Rodríguez, N. N., Capote, M., & Zamora, V. (1999). Cultivo in vitro del aguacatero (Persea americana Mill.). <i>Revista Chapingo Serie Horticultura</i> , 5, 231-237.
Efecto de la sacarosa y cotiledones sobre el prendimiento de microinjertos in vitro de naranja y limón (citrus sp.)	Llivia Quispe, L. (2018). Efecto de la sacarosa y cotiledones sobre el prendimiento de microinjertos in vitro de naranja y limón (citrus sp.)
Microinjerto de ápices caulinares in vitro para saneamiento de "virus de la tristeza de cítricos" (CTV) en Tangelo minneola "tangelo" y Citrus limón variedad eureka "limón"	Tirabante Terrones, N. (2018). Microinjerto de ápices caulinares in vitro para saneamiento de "virus de la tristeza de cítricos"(CTV) en Tangelo minneola" tangelo" y Citrus limón variedad eureka" limón".
Conservación in vitro de las variedades de vid Monastrell, Esclafacherre y Bobal	Martínez Pérez, N. (2015). Conservación in vitro de las variedades de vid Monastrell, Esclafacherre y Bobal
Obtención de plantas de naranjo dulce Citrus sinensis (L.) Osbeck V. Folha murcha, libres del virus de la psorosis a través de	Godoy, G. M., Romero, N. V., & Segnana, L. G. (2013). Obtención de plantas de naranjo dulce Citrus sinensis (L.) Osbeck V. Folha murcha, libres del virus de la psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices

<p>termoterapia y microinjerto de ápices caulinares in vitro</p>	<p>caulinares in vitro. Investigación Agraria, 6(1), 15-19.</p>
<p>Adaptación de la técnica de Microinjertación in vitro de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. X Citrus sinensis (L.) Osbeck) y Citrumelo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. X Citrus paradisi Macf.)</p>	<p>Cortés-Paniagua, R. (2004). Adaptación de la técnica de Microinjertación in vitro de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple utilizando patrones de Carrizo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck) y Citrumelo (Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus paradisi Macf.).</p>
<p>Cuatro modalidades de Microinjerto tres Auxinas (Ana, Aia, Aib) en el manejo In Vitro de Plantas de Limonero (Citrus aurantifolia Christm.) Y Naranja (Citrus sinensis L.)</p>	<p>Coloma, F. (2017). Cuatro modalidades de Microinjerto tres Auxinas (Ana, Aia, Aib) en el manejo In Vitro de Plantas de Limonero (Citrus aurantifolia Christm.) y. Investigación, Innovación y Desarrollo, 18(1), 97.</p>
<p>Cultivo in vitro de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar</p>	<p>Martínez-Hernández, M. D. J., Alonso López, A., Osorio-Acosta, F., Gallardo López, F., López Moctezuma, H., & Mata Rosas, M. (2006). Cultivo in vitro de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. Interciencia, 31(8), 616-619.</p>
<p>Establecimiento de un protocolo para la propagación in vitro de semillas y meristemos de poncirus trifoliata var. Monstruosa (flying dragon)</p>	<p>Lozano Camargo, J. L. (2016). Establecimiento de un protocolo para la propagación in vitro de semillas y meristemos de poncirus trifollata var. monstruosa (flying dragon) (Doctoral dissertation).</p>
<p>Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (Fragaria X ananassa Duch.)</p>	<p>Cuevas, M. C. S., & Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (Fragaria X ananassa Duch.). Revista Científica UDO Agrícola, 4(1), 21-26.</p>

<p>Microinjertación in vitro en cítricos a escala comercial en el valle del cauca</p>	<p>Angarita Vanegas, H., & Zamora Montoya, L. A. (2004). Microinjertación in vitro en cítricos a escala comercial en el valle del cauca. <i>Fitotecnia Colombiana</i>, 81-84.</p>
<p>Estudios in vitro sobre la técnica de microinjerto en dos cultivares de cítricos para producir plantas libres de virus"</p>	<p>Naz, A., Jaskani, M., Research, A., & Qasim, A. (2007). In vitro studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. <i>Pakistan Journal of Botany</i>, 1773-1778.</p>
<p>Evaluación de la eficacia de los métodos de mini injertos hendidura, t invertida y yema terminal en la propagación de plantas de naranja valencia (Citrus sinensis (L.) Osbeck.)</p>	<p>Álvarez Correa, C. C. (2020). Evaluación de la eficacia de los métodos de mini injertos hendidura, t invertida y yema terminal en la propagación de plantas de naranja valencia (citrus sinensis (L.) osbeck).</p>
<p>Producción de plántulas de limón criollo (Citrus aurantifolia) mediante la técnica de micropropagación in vitro</p>	<p>Arrieta Padilla, E. P., & Rico Herrera, H. E. (2018). Producción de plántulas de limón criollo (Citrus aurantifolia) mediante la técnica de micropropagación in vitro.</p>
<p>Establecimiento in vitro de lima ácida (Citrus aurantiifolia [Christm.] Swingle.) - variedad Tahití- a partir de meristemas axilares</p>	<p>Santiana, W. R. (2014). Establecimiento in vitro de lima ácida (Citrus aurantiifolia [Christm.] Swingle.)-variedad Tahití-a partir de meristemas axilares.</p>
<p>Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" Swietenia macrophylla King (Meliaceae)</p>	<p>Campos Ruiz, J., Arteaga Cuba, M., Campos Ruiz, S., Chico Ruíz, J., & Cerna Rebaza, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" Swietenia macrophylla King (Meliaceae). <i>Arnaldoa</i>, 27(1), 141-156.</p>

<p>Propagación in vitro de lima ácida (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swingle) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales</p>	<p>Vidal, R., & Marco, V. (2014). Propagación in vitro de lima ácida (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swingle)-variedad Tahití-a partir de segmentos nodales.</p>
<p>Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (<i>Rubus idaeus</i> L.)</p>	<p>Jones-Castro, F., & Flores-Mora, D. M. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (<i>Rubus idaeus</i> L.). <i>Revista Tecnología en Marcha</i>, 20(3), ág-46.</p>
<p>Establecimiento in vitro del portainjerto de durazno gxn (Garfield- Nemared), con brotes de verano, en laboratorio de cultivos in vitro.</p>	<p>Mamani Cruz, A, Mercado, L & Romero M (2020). Establecimiento in vitro del portainjerto de durazno gxn (Garfield- Nemared), con brotes de verano, en laboratorio de cultivos in vitro.</p>
<p>Potencial de propagación in vitro para el tomate de árbol partenocárpico <i>Cyphomandra betacea</i> Cav. (Sendt)</p>	<p>Espinosa Orrego, A, Trillos González, O, Hoyos Sánchez, Afanador Kafuri, L & Correa Londoño, G (2005). Potencial de propagación in vitro para el tomate de árbol partenocárpico <i>cyphomandra betacea</i> cav. (sendt)</p>
<p>Ensayo de la técnicas de microinjertación de yemas de naranjo dulce <i>citrus sinensis</i> L. Osbeck en micropatrones de naranjo agrio <i>citrus aurantium</i> l.</p>	<p>BARRERAS VALDEZ, S. I. L. V. E. S. T. R. E. (1990). Ensayo de la técnicas de microinjertación de yemas de naranjo dulce <i>citrus sinensis</i> L. Osbeck en micropatrones de naranjo agrio <i>citrus aurantium</i> l.</p>
<p>Diagnóstico Biológico del Viroide exocortis de los cítricos.</p>	<p>MENDOZA, S. A. (19). Diagnóstico Biológico del Viroide exocortis de los cítricos.</p>

<p>Criopreservación de brotes apicales de Citrus sinensis mediante la técnica de Encapsulación-Vitrificación-Deshidratación</p>	<p>Vega Pérez, J. (2004). Criopreservación de brotes apicales de Citrus sinensis mediante la técnica de Encapsulación-Vitrificación-Deshidratación (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).</p>
<p>Reactivación de material vegetal élite de Pinus radiata d. Don. Mediante microinjerto in vitro. Interciencia.</p>	<p>Materán, M. E., Vega, M. C., Sánchez-Olate, M., Sáez, K., Rodríguez, R., & Ríos, D. (2008). Reactivación de material vegetal élite de Pinus radiata d. Don. Mediante microinjerto in vitro. Interciencia, 33(1), 66-70.</p>
<p>Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento in vitro de microinjertos</p>	<p>Rache-Cardenal, Leidy, Rojas-Pinzón, Emilcen, & Pacheco-Maldonado, José. (2008). Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento in vitro de microinjertos. <i>Bioagro</i>, 20(1), 57-65. Recuperado en 11 de abril de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612008000100007&lng=es&tlng=es.</p>
<p>Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México</p>	<p>Varela González, F. (2015). <i>Establecimiento aséptico y microinjerto de explantes de cítricos certificados de importancia agronómica para el noreste de México</i>. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Nuevo León.</p>
<p>Regeneración in vitro de Naranja Agrio</p>	<p>Vega Pérez, J. (1997). <i>Regeneración in vitro de Naranja Agrio</i>. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Facultad de Ciencias Biológicas</p>
<p>Norma oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009</p>	<p>Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2009). Norma oficial Mexicana de</p>

	Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009. México
Establecimiento y multiplicación in vitro de Citrus aurantifolia Christm. Swing. var. 'Mexicana' a partir de semillas	Hernández Jerez, Y., Silva Pupo, J., Borges García, M. (2013). Establecimiento y multiplicación in vitro de Citrus aurantifolia Christm. Swing. var. 'mexicana' a partir de semillas. <i>Biotecnología Vegetal</i>
Improvement of Shoot-tip Grafting in vitro for Virus-free Citrus	Navarro, L., Roistacher, C., & Murashige, T. (1975). Improvement of Shoot-tip Grafting in vitro for Virus-free Citrus. <i>Journal of the American Society for Horticultural Science</i> , 471-479.
Microinjerto de ápices Caulinares	Navarro, L., & Juárez, J. (2005). <i>Phytoma</i> . Obtenido de Microinjerto de ápices caulinares de cítricos in vitro: https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/170-junio-julio-2005/microinjerto-de-pices-caulinares-de-citricos-in-vitro
<i>La injertación en frutales</i>	Valentini, G. (2003). <i>La injertación en frutales</i> . San Pedro: Comisión de Publicaciones de la EEA San Pedro.
Formación de un banco de variedades de citros libres de virus: obtención de plantas mediante la técnica de microinjerto.	Gravina, A., & Piestun, D. (1991). <i>Formación de un banco de variedades de citros libres de virus: obtención de plantas mediante la técnica de microinjerto</i> . Montevideo: Universidad de la Republica de Agronomía.
Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de Aspidosperma polyneuron.	García Lozano, D., Mesa López, N., & Ocampo Guerrero, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de Aspidosperma polyneuron. <i>Revista Colombiana de Biotecnología</i> , 76-84.

<p>Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.</p>	<p>Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. <i>CIAT</i>.</p>
<p>Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento in vitro de microinjertos.</p>	<p>Rache Cardenal, L., Rojas Pinzón, E., & Pacheco Maldonado, J. (2008). Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento in vitro de microinjertos. <i>Bioagro</i>, 57-65.</p>
<p>Conservación in vitro de germoplasma de vid</p>	<p>Muñoz, P., San Pedro, T., Martínez, N., & Gisbert, C. (2015). Conservación in vitro de germoplasma de vid. In <i>XI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in Vitro de Tejidos Vegetales: 3 y 4 septiembre de 2015 Fundación Universidad Empresa de Valencia-Adeit Plaza Virgen de la Paz</i>, Fundación Universidad Empresa de Valencia.</p>
<p>Enfermedades de los Cítricos en Colombia.</p>	<p>Castro Caicedo, B. L., Timmer, L., Leguizamón Caycedo, J. E., Walter Müller, G., & Corrales Giraldo, J. A. (2000). <i>Enfermedades de los Cítricos en Colombia</i>. Bogotá: Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola.</p>
<p>Caracterización fisicoquímica en poscosecha de diferentes materiales de lima ácida Tahití (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) para exportación.</p>	<p>Arévalo, P. A., Parra Coronado, A., & Orduz Rodríguez, J. O. (2016). Caracterización fisicoquímica en poscosecha de diferentes materiales de lima ácida Tahití (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) para exportación. <i>Revista colombiana de ciencias hortícolas</i>, 241-251.</p>
<p>Evaluación de tres métodos de injertación in vitro en la especie <i>Erythrina edulis</i> (Fabaceae).</p>	<p>Bonilla Sánchez, A., & Mesa López, N. (2018). Evaluación de tres métodos de injertación in vitro en la especie <i>Erythrina edulis</i> (Fabaceae). <i>Revista Facultad de Ciencias Básicas</i>, 85-90.</p>

<p>Saneamiento de cítricos - Microinjerto de ápices caulinares in vitro.</p>	<p>Camacho, O. (S.F.). <i>Saneamiento de cítricos - Microinjerto de ápices caulinares in vitro</i>. Habana: Instituto de investigaciones den Fruticultura Tropical.</p>
<p>Tres décadas del saneamiento de cultivares de cítricos en Cuba.</p>	<p>Zamora, V., González, M., Peña, I., & Pérez, J. (2007). Tres décadas del saneamiento de cultivares de cítricos en Cuba. <i>CitriFrut</i>.</p>
<p>Saneamiento y certificación de cítricos.</p>	<p>Bertalmío, A., Maeso, D., Sanguinetti, G., Fontán, G., De los Santos, M., Borde, J., Rivas, F. (2012). Saneamiento y certificación de cítricos. <i>INIA</i>, 49-53</p>
<p>Importancia de la Técnica de microinjerto in vitro en un programa y un sistema de cuarentena para cítricos</p>	<p>González, M. (1987). Importancia de la Técnica de microinjerto in vitro en un programa y un sistema de cuarentena para cítricos. <i>Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y otros Frutales</i>, 37-15.</p>
<p>Diagnóstico y caracterización de la enfermedad huanglongbing de los cítricos para el establecimiento de su manejo en Cuba</p>	<p>Hernández Rodríguez, L., & Collazo Cordero, C. (2016). Diagnóstico y caracterización de la enfermedad huanglongbing de los cítricos para el establecimiento de su manejo en Cuba. <i>Anales de la Academia de Ciencias de Cuba</i>.</p>
<p>Propagación y establecimiento de variedades de durazno, ciruelo y chabacano</p>	<p>Jaramillo Santibañes, L, Martínez Jaimes, O & Elías Román, R. (2018, 26 de noviembre). Propagación y establecimiento de variedades de durazno, ciruelo y chabacano. Obtenido de https://www.educacionrespuntocero.com/recursos/webs-bibliografias-de-los-trabajos/ .</p>