

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. 'Mexicana' a partir de semillas

Yanet Hernández Jerez*, Juan José Silva Pupo, Misterbino Borges García. *Autora para correspondencia.

Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo km 17, Apdo 21, Bayamo, Granma, Cuba. CP 85 100. e-mail: yhernandezj@udg.co.cu.

RESUMEN

Los cítricos son cultivos con un alto valor económico y medicinal. El limón criollo (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing) var. 'Mexicana' es muy consumido en Cuba pero la incidencia de plagas y enfermedades ha afectado las producciones. El objetivo de este trabajo consistió en lograr su establecimiento y multiplicación *in vitro*. Semillas de frutos maduros se desinfectaron con NaOCl (0.5, 1.0, 1.5%) y diferentes tiempos de inmersión (5, 10 y 20 minutos). A los 7 días se cuantificó el número de explantes contaminados con microorganismos, con necrosis y vivos. Posteriormente se determinó el efecto de reguladores del crecimiento en el establecimiento (6-BAP, AG₃ y AIB) y en la multiplicación (6-BAP, AG₃). Los resultados indicaron que el hipoclorito de sodio tuvo efecto en la desinfección de las semillas y en la supervivencia. Con NaOCl al 1% durante 20 min se obtuvieron los mejores resultados. Se demostró que para la germinación de las semillas no es necesaria la adición de reguladores del crecimiento y para la multiplicación la inclusión de 1.0 mg l⁻¹ de AG₃ y 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP permitió obtener mayor número de brotes y coeficiente de multiplicación. El protocolo establecido podría emplearse en futuros estudios de mejoramiento genético.

Palabras clave: micropropagación, reguladores del crecimiento, segmentos nodales

In vitro establishment and multiplication of *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. 'Mexicana' from seeds

ABSTRACT

Citrus fruits are crops with high economic and medicinal value. The creole lime (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing) var. 'Mexican' is widely consumed in Cuba but the incidence of pests and diseases has affected its production. The aim of this work was to achieve its establishment and *in vitro* multiplication. Seeds from mature fruits were disinfected with NaOCl (0.5, 1.0, 1.5%) and different immersion times (5, 10 and 20 minutes). At 7 days the number of explants contaminated with microorganisms, with necrosis and alive was quantified. Subsequently the effect of growth regulators on the establishment stage (6-BAP, GA₃ and IBA) and in multiplication stage (6-BAP, GA₃) was determined. The results indicated that the sodium hypochlorite was effective in disinfection of seeds and in its survival. With 1% NaOCl for 20 min the best results were obtained. It was shown that for seed germination adding growth regulators is not required but for multiplication the inclusion of 1.0 mg l⁻¹ GA₃ and 2.0 mg l⁻¹ 6-BAP yielded higher number of shoots and coefficient multiplication. The established protocol could be used in future studies of plant breeding.

Key words: micropropagation, nodal cutting, plant growth regulators.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos son uno de los cultivos frutales más ampliamente distribuidos y consumidos en el mundo con un alto valor económico y medicinal. Dentro de los cítricos de valor comercial, la naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), mandarina (*C. reticulata* Banco) y naranja agria (*C. auranticum* L.) contribuyen aproximadamente al 80.0% de la producción

mundial (FAOSTAT, 2011). Otro grupo de frutales importantes desde el punto de vista comercial son la lima (*C. aurantifolia* Swingle), el limón (*C. limon* Burn f.), y el pomelo (*C. grandis* L. Osbeck) pero están distribuidos en una escala relativamente menor.

En Cuba es muy apreciado el limón criollo var. 'Mexicana', que no es un verdadero limón

sino una variedad hortícola de la lima (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing.) (familia *Rutaceae*). Es una especie común que crece en algunas montañas y en terrenos calizos abiertos. Sin embargo, las plantaciones han sufrido pérdidas cuantiosas por la incidencia de plagas y enfermedades. Tomando en consideración lo antes planteado, se requiere de estrategias que contribuyan a su recuperación. El establecimiento de protocolos para la propagación *in vitro* de esta variedad permitiría contar con una herramienta para futuros estudios de mejoramiento genético. Por ello, esta investigación tuvo como objetivo lograr el establecimiento y multiplicación *in vitro* del limón criollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon semillas de frutos maduros de limón criollo (*Citrus aurantifolia*), procedentes de plantas de 10 años de cultivo de la localidad 'El Dorado', municipio Bayamo.

Establecimiento

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 4.32 g l⁻¹, vitaminas MS 5.0 ml, sacarosa 30 g l⁻¹, agar 6 g l⁻¹ y pH 5.7 antes de la esterilización en autoclave.

Los frutos se lavaron con agua y detergente, se colocaron durante 30 minutos en agitación continua en zaranda orbital, posteriormente

se lavaron con agua corriente y en la cabina de flujo laminar se extrajeron las semillas para evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio (NaOCl) durante distintos tiempos de inmersión. Se evaluaron tres concentraciones (0.5, 1.0, 1.5%) de NaOCl (v/v), durante tres intervalos de tiempo (5, 10 y 20 minutos) (Tabla1). Seguidamente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril y para el establecimiento *in vitro* se les eliminó la testa y fueron colocadas una semilla por tubo de ensayo de 150 x 25 mm, con 10 ml de medio de cultivo basal MS sin reguladores del crecimiento.

A los 7 días se cuantificó el número de explantes contaminados con microorganismos, con necrosis y vivos. Con estos valores se calculó el porcentaje de contaminación, de necrosis y supervivencia (explantes en buen estado de crecimiento que no se contaminaron ni se necrosaron). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 50 semillas por cada tratamiento y tres réplicas.

Posteriormente, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo MS sobre el establecimiento *in vitro* de semillas de frutos de limón criollo. Se empleó el mejor método de desinfección del experimento anterior y una vez desinfectadas las semillas, se establecieron en el medio de cultivo basal MS con la adición de distintas combinaciones de ácido giberélico (AG₃), 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolbutírico (AIB) según los siguientes tratamientos:

Tabla 1. Tratamientos empleados para la desinfección de semillas *Citrus aurantifolia*.

Tratamientos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min)
1	0.5	5
2	0.5	10
3	0.5	20
4	1.0	5
5	1.0	10
6	1.0	20
7	1.5	5
8	1.5	10
9	1.5	20

siguientes tratamientos: T1- control, T2- 1.0mg l⁻¹ AG₃ y 0.1 mg l⁻¹ de AIB, T3- 2.0 mg l⁻¹ AG₃, 1.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 0.1 mg l⁻¹ AIB, T4- 3.0 mg l⁻¹ AG₃, 2.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 0.1 mg l⁻¹ AIB.

A las cuatro semanas posteriores a la siembra se midió la longitud de las plantas *in vitro* (cm) y se cuantificó el número yemas y de hojas por planta. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 100 semillas por cada tratamiento con tres réplicas.

Multiplicación

Con el objetivo de determinar el efecto de diferentes combinaciones de AG₃ y 6-BAP en la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de limón criollo se emplearon brotes procedentes de la fase de establecimiento con 4 semanas de establecidas, los cuales se cultivaron en el medio de cultivo basal MS, con la adición de AG₃ y 6-BAP en diferentes combinaciones. Se realizaron dos subcultivos cada 4 semanas para la determinación del coeficiente de multiplicación. Los tratamientos fueron los siguientes: T1- control, T2- 1.0 mg l⁻¹ AG₃ y 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, T3- 2.0 mg l⁻¹ AG₃, T4- 3.0 mg l⁻¹ AG₃ y 1.0 mg l⁻¹ 6-BAP.

A las cuatro semanas posteriores a la siembra se cuantificó el número de brotes por explante y el número de yemas. Además, se midió la longitud de los brotes (cm), y se calculó el coeficiente de

multiplicación (número de yemas en brotes mayores de 5 mm).

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 30 explantes por cada tratamiento con tres réplicas.

Análisis estadístico

Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov – Smirnov y para la homogeneidad de varianzas la prueba de Bartlett. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey (p<0.05). Todos los análisis se efectuaron a través del programa Estadística para WINDOWS, versión 10.0 (StatSoft, 2011).

RESULTADOS

Establecimiento

Se logró la desinfección de las semillas con el uso de hipoclorito de sodio (NaClO). Los mejores resultados se obtuvieron con la solución desinfectante al 1.0% durante 20 minutos (Tratamiento 6). En este tratamiento se alcanzó un 88% de supervivencia con 12% de contaminación microbiana con diferencias con respecto al resto de los tratamientos evaluados (Tabla 2).

Se observó que la mayor parte de los contaminantes microbianos detectados se correspondieron con hongos filamentosos y bacterias.

Tabla 2. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de semillas de *Citrus aurantifolia*.

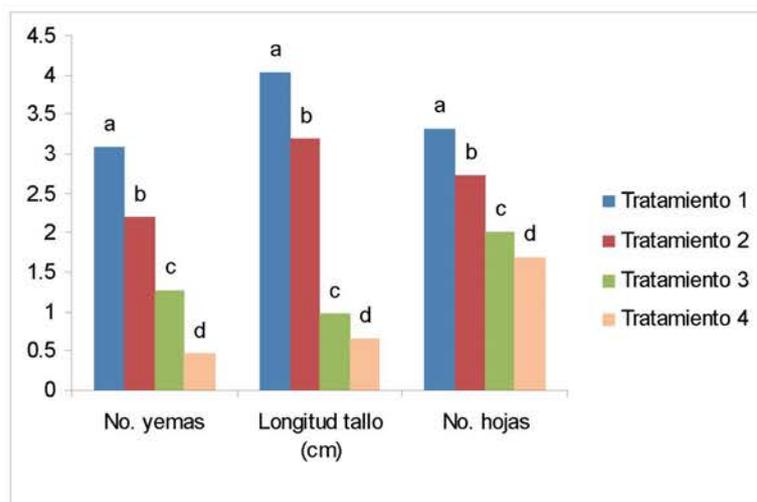
Tratamientos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)	Necrosis (%)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)
1	0.5	5	1c	74a	15c
2	0.5	10	1c	65a	34b
3	0.5	20	1c	55a	44b
4	1	5	1c	39a	60b
5	1	10	1c	34ab	65ab
6	1	20	0c	12c	88a
7	1.5	5	20b	45a	35b
8	1.5	10	45b	25b	30c
9	1.5	20	55 a	35b	10c
EE			0.05	1.49	1.52

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de Tukey para p<0.05.

Los resultados de la influencia de distintas combinaciones de AG_3 , 6-BAP y AIB en el establecimiento *in vitro* de semillas de *Citrus aurantifolia* sobre el número de yemas, longitud del tallo y número de hojas se muestra en la figura 1. Como se aprecia los mayores valores se correspondieron con el tratamiento control (T1) compuesto por el medio de cultivo basal sin adición de los reguladores del crecimiento (Figuras 1 y 2).

Multiplicación *in vitro*

La influencia de distintas combinaciones de AG_3 y 6-BAP en el medio de cultivo MS en la multiplicación de segmentos nodales de *Citrus aurantifolia* sobre el número de brotes (Figuras 3 y 4) mostró que los mayores valores (8.61) correspondieron al Tratamiento 2 compuesto por el medio de cultivo basal MS con la adición de 1.0 mg l^{-1} de AG_3 y 2.0 mg l^{-1} de 6-BAP.

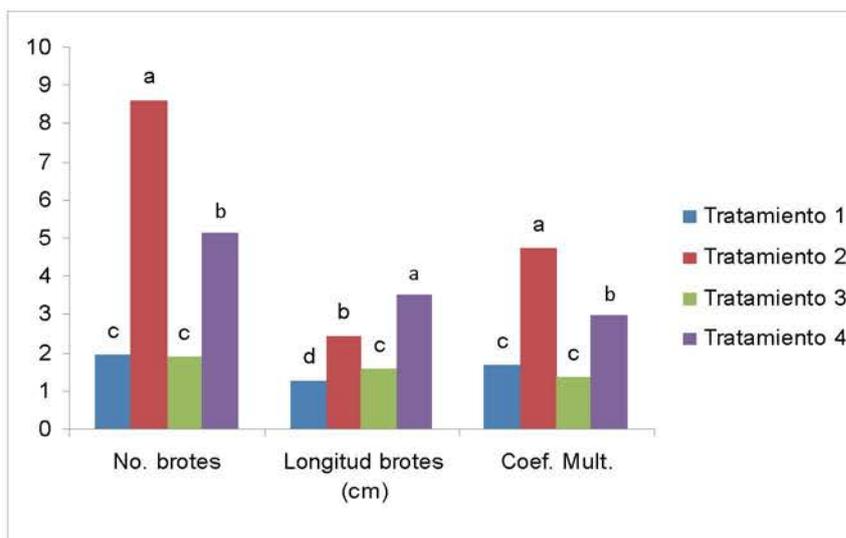


Letras diferentes sobre barras en cada variable indican diferencias significativas según la prueba de Tukey para $p < 0.05$.

Figura 1. Efecto de distintas combinaciones de AG_3 , 6-BAP y AIB en el medio de cultivo MS sobre el número de yemas, longitud del tallo y número de hojas en el establecimiento *in vitro* de semillas de *Citrus aurantifolia* a los 30 días de cultivo. Tratamientos: T1: sin reguladores del crecimiento, T2: $1.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3 + 0.1 \text{ mg l}^{-1} AIB$, T3: $2.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3 + 1.0 \text{ mg l}^{-1} 6\text{-BAP} + 0.1 \text{ mg l}^{-1} AIB$, T4: $3.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3 + 2.0 \text{ mg l}^{-1} 6\text{-BAP} + 0.1 \text{ mg l}^{-1} AIB$.



Figura 2. Plantas *in vitro* de *Citrus aurantifolia* en la fase de establecimiento en el medio de cultivo basal MS sin la adición de reguladores del crecimiento.



Letras diferentes sobre barras en cada variable indican diferencias significativas según la prueba de Tukey para $p < 0.05$.

Figura 3. Efecto de distintas combinaciones de AG_3 y 6-BAP en el medio de cultivo MS sobre el número de brotes, longitud de brotes y coeficiente de multiplicación en plantas *in vitro* de *Citrus aurantifolia* en la fase de multiplicación a los 30 días de cultivo. Tratamientos: T1: sin reguladores del crecimiento, T2: $1.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3 + 2.0 \text{ mg l}^{-1} 6\text{-BAP}$, T3: $2.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3$, T4: $3.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3 + 1.0 \text{ mg l}^{-1} 6\text{-BAP}$.

DISCUSIÓN

Los cítricos son cultivos de gran importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, la incidencia de plagas y enfermedades ha mermado las producciones en numerosas plantaciones.

En este trabajo se emplearon semillas de frutos maduros de limón criollo para establecer plantas *in vitro*. Se comprobó que el hipoclorito de sodio tuvo efecto en la desinfección de las semillas y en la supervivencia. Con la concentración intermedia probada de 1% se obtuvieron los mejores resultados. Con la inferior (0.5%) la contaminación microbiana fue alta y con la mayor (1.5%) se incrementó la necrosis de los explantes. Por otra parte, la adición de reguladores de crecimiento en esta fase tuvo un efecto negativo sobre las variables evaluadas. Posiblemente el contenido endógeno de estas sustancias en las semillas fue suficiente para la germinación y la adición externa provocó un desbalance que afectó la germinación de las semillas y el crecimiento de los explantes.

Para el establecimiento *in vitro* de cítricos se han empleado diferentes explantes entre los

que se encuentran: segmentos nodales de árboles adultos (Al-Khayri y Al-Bahrany, 2001; Rathore *et al.*, 2007; Pérez-Tornero *et al.*, 2010), yemas apicales y segmentos nodales de plantas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* (Kambre *et al.*, 2005), cotiledones de semillas de frutos maduros (Sarma *et al.*, 2011), entre otros.

El establecimiento de protocolos para obtener material vegetal homogéneo tiene un uso potencial en estudios de mejoramiento genético y saneamiento de patógenos en especies de *Citrus* (Sarma *et al.*, 2011).

En la fase de multiplicación el uso combinado de $1.0 \text{ mg l}^{-1} AG_3$ y $2.0 \text{ mg l}^{-1} 6\text{-BAP}$ permitió obtener 8.61 brotes por explante y el mayor coeficiente de multiplicación con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 1). Estos resultados coincidieron con los informados por Pérez-Tornero *et al.* (2010) quienes al analizar diferentes combinaciones de 6-BAP y AG_3 en el medio de cultivo alcanzaron los mayores valores significativos para el número de brotes con la misma combinación de reguladores del crecimiento en la multiplicación de limón.



Figura 4. Segmentos nodales en la fase de multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantifolia* en el medio de cultivo (A) MS + 1 mg l⁻¹ AG₃ + 2.0 mg l⁻¹ 6-BAP y (B) MS + 2.0 mg l⁻¹ AG₃ + 1.0 mg l⁻¹ 6-BAP.

Otros autores han informado del uso de otras combinaciones de reguladores del crecimiento en la multiplicación de especies de cítricos. Por ejemplo, Al-Khayri y Al-Bahrany (2001) en la micropropagación de *Citrus aurantifolia* emplearon un medio de cultivo MS con 1.0 mg l⁻¹ y 0.5 mg l⁻¹ de kinetina donde obtuvieron ocho brotes por segmento nodal. De igual forma, Rathore *et al.* (2007) lograron mayor producción de brotes en el medio de cultivo MS con 5.0 mg l⁻¹ 6-BAP en la multiplicación de *Citrus limon*.

Carimi y De Pasquale (2003) señalaron que las giberelinas son frecuentemente empleadas para promover la elongación de los tallos en los cítricos. En este sentido, Pérez-Tornero *et al.* (2010) observaron que la adición de AG₃ en el medio de cultivo fue esencial para la multiplicación óptima de explantes de *Citrus limon*. También demostraron que el AG₃ tuvo una influencia más significativa sobre la multiplicación que el 6-BAP.

Los resultados de esta investigación reafirman los logrados por Tallón *et al.* (2012) al evaluar diferentes concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo durante la micropropagación de naranja agria, donde determinaron que 2 mg l⁻¹ en el medio de cultivo MS arrojó el mayor coeficiente de multiplicación *in vitro*. Se continúan los estudios para lograr el enraizamiento de las plantas *in vitro*.

CONCLUSIONES

Mediante los ensayos realizados se logró el establecimiento y multiplicación *in vitro* del

limón criollo a partir de semillas germinadas *in vitro*. La utilización de hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos demostró la mayor efectividad en la desinfección de las semillas. Se comprobó que para la germinación de las semillas no fue necesaria la adición de reguladores del crecimiento. En la fase de multiplicación la inclusión en el medio de cultivo de 1.0 mg l⁻¹ de AG₃ y 2.0 mg l⁻¹ 6-BAP permitió obtener mayor número de brotes y coeficiente de multiplicación.

REFERENCIAS

- Al-Khayri, JM, Al-Bahrany AM (2001) *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia*. Current Science 81(9): 10
- Carimi, F, De Pasquale F (2003) Micropropagation of Citrus. En: Jain SM y Ishii K (Eds) Micropropagation of woody trees and fruits, pp 589–619. Kluwers Academic Publisher. Dordrecht
- FAOSTAT (2011) FAOSTAT database. [En línea] Disponible en: <http://www.faostat.fao.org>. Consultado 23 septiembre de 2012
- Kamble AB, More TA, Karale AR, Patil SC (2005) *In vitro* micropropagation of acid lime (*Citrus aurantifolia* S) var. Sai-Sharbat. En: Keshavachandran R, Nazeem P, Girija D, John PS, Peter KV (Eds) Recent trends in horticultural biotechnology, pp. 123-127. Vol. I. ICAE National symposium on biotechnological interventions for improvement of horticultural crops: issues and strategies. 10-12 January, 2005. Vellanikkara, Kerala, India
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473–497

Pérez-Tornero, O, Tallón CI, Porras I (2010) An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 100: 263-271

Rathore, JS, Rathore MS, Singh M, Singh RP, Shekhawat NS (2007) Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian Journal of Biotechnology.* 6: 239-244

Sarma Chayanika, Ananya Borthakur, Salvinder Singh, Mahendra Kumar Modi, Priyabrata Sen (2011) Efficient *in vitro* plant regeneration from cotyledonary explants of *Citrus reticulata* L. Blanco. *Annals of Biological Research* 2 (6): 341-348

Tallón, CI, Porras I, Pérez-Tornero O (2010) An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 100: 263-271

Tallón, CI, Porras I, Pérez-Tornero O (2012) Efficient propagation and rooting of citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In vitro Cell.Dev.Biol-Plant* 48: 488-499

Recibido: 20-05-2013

Aceptado: 23-07-2013