

Protocolo para la aclimatización de plantas *in vitro* de *Citrus* spp.

María I Oloriz^{1*}, Ernesto Cárdenas^{1,2}, Marilín Hernández¹, Leniel Cuevas¹, Ortelio Hurtado¹, Bárbara Ocaña¹, Luis E Rojas¹, Novisel Veitía¹, Leonardo Rivero¹, Milady Mendoza-Rodríguez¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP54830.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP54830.

RESUMEN

Los cítricos (*Citrus* spp.) son cultivos de gran importancia económica por la calidad de sus frutos y su valor nutricional. La demanda de material vegetal de plantación puede ser asistida por la propagación *in vitro* de plantas donde la aclimatización es una fase crucial del proceso. El objetivo de este trabajo fue presentar un protocolo para la aclimatización de plantas *in vitro* de *Citrus* sp. con alta supervivencia de la población de plantas y aptas para el injerto. El protocolo se ha empleado en plantas de *Citrus macrophylla*, Citrange Carrizo y Citrange C35 y podría aplicarse a otros cultivares del tipo de portainjertos. Asegura la supervivencia de la población de plantas superior al 97%, en un estado fitosanitario y fisiológico que facilita su crecimiento activo. Se alcanzan los parámetros para el injerto de las plantas a los seis meses de crecimiento *ex vitro* en casa de cultivo protegido.

Palabras clave: adaptación *ex vitro*, iluminación, riego, sustrato

Protocol for the acclimatization of *in vitro* *Citrus* spp. plants

ABSTRACT

Citrus (*Citrus* spp.) are crops of great economic importance due to the quality of their fruits and their nutritional value. The demand for planting material can be met by *in vitro* propagation of plants, where acclimatization is a crucial phase of the process. The objective of this work was to present a protocol for the acclimatization of *in vitro* *Citrus* sp. plants with high plant population survival rates and suitable for grafting. The protocol has been used on *Citrus macrophylla*, Citrange Carrizo, and Citrange C35 plants and could be applied to other rootstock cultivars. It ensures plant population survival rates of over 97%, with a phytosanitary and physiological state that facilitates active growth. The parameters for grafting are reached after six months of *ex vitro* growth in a protected culture house.

Keywords: *ex vitro* adaptation, lighting, irrigation, substrate

INTRODUCCIÓN

Los cítricos (*Citrus* spp.) son cultivos de gran importancia económica por la calidad de sus frutos y su valor nutricional. Sus producciones alcanzan a nivel mundial 143 millones de toneladas por un valor de producción bruta de 66.4 millones de dólares (FAO, 2021). A escala productiva se necesita un gran número de plantas portainjertos para cubrir la demanda. Para cubrirla la propagación *in vitro* puede hacer contribuciones importantes.

Editora:

Yelenys Alvarado-Capó
Instituto de
Biotecnología de las
Plantas, Universidad
Central Marta Abreu de
Las Villas.

*Correspondencia:

e-mail: maria@ibp.co.cu

Recibido: 20-11-2023

Aceptado: 07-01-2024

Copyright:

Este es un artículo de
acceso abierto
distribuido bajo una
Licencia Creative
Commons Atribución-
NoComercial 4.0
Internacional (CC BY-NC
4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido
su uso, distribución o
reproducción citando la
fuente original y los
autores.

La aclimatización de plantas procedentes del cultivo *in vitro* es una fase crucial del proceso de micropropagación. Durante esta fase ocurren cambios en la superficie de las hojas, como la formación de la capa de cera, incremento en el número de estomas, en la capacidad fotosintética y de absorción de agua y nutrientes. La influencia de la luz, la temperatura, humedad, condiciones del suelo y el estrés biótico, entre otros, pueden afectar la correcta adaptación y desarrollo de las plantas. Por ende, se requiere establecer protocolos de trabajo que aseguren las condiciones óptimas para la supervivencia de estas plantas a las condiciones *ex vitro*.

En algunas especies de plantas leñosas se incorporan en sus protocolos de aclimatización, combinaciones de reguladores de crecimiento, inductores de la resistencia y microorganismos con actividad protectora de plantas frente al estrés. Incluso, pueden recomendar el uso de estimuladores del enraizamiento en la etapa de crecimiento *ex vitro* para especies como *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile, *Citrus limon* (L.) Osbeck y *Syzygium cumini* (L.) (Rathore *et al.*, 2004). En *Citrus* se ha empleado 8-Hydroxyquinolina para el control del contenido relativo de agua (Hazarika y Parthasarathy, 2002), paclobutrazol (Hazarika *et al.*, 2002) y glicerol (Rattanpal y Prakash, 2015) para incrementar la supervivencia de las plantas. Kumar *et al.* (2010) estableció un protocolo de adaptación *ex vitro* de especies como Carrizo, limón rugoso, Cleopatra, Kinnow LS, en el que utilizó el fungicida Bavastin al 0.2% en las raíces previo a la plantación combinado con varias aplicaciones de solución de Hoglands, en este caso se obtuvieron entre 75 y 90% de supervivencia de las plantas a los 60 días. Aunque estas investigaciones han logrado buenos resultados durante la aclimatización, se necesita desarrollar protocolos sencillos y de bajo costo que garanticen altos porcentajes de supervivencias de las plantas.

Teniendo en cuenta estos elementos, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la aclimatización de plantas de *Citrus* spp. procedentes del cultivo *in vitro* que permitiera obtener alta supervivencia de la población de plantas aptas para el injerto.

PRECAUCIONES Y MEDIDAS

El procedimiento que se describe a continuación se recomienda para la aclimatización de plantas de cítricos provenientes del cultivo *in vitro*, ya sea obtenidas vía organogénesis o embriogénesis somática, con sistema radical que supere los 3.5 cm de longitud.

Los puntos más importantes a tener en cuenta son mantener las plantas turgentes, sin superar la capacidad de campo del sustrato y no exponer las plantas directamente a la luz solar hasta al menos dos semanas de plantadas, para evitar la clorosis de las hojas, principalmente las hojas más jóvenes. Además, estas plantas deben mantenerse en condiciones de casa de cultivo protegido para evitar la infección por plagas que afectan el cultivo y cumplir con las normas sanitarias y organizativas del manejo de la plantación y de las casas de cultivo.

Es necesario durante todo el proceso mantener las medidas que aseguren que las casas de cultivo no se introduzcan plagas. Entre ellas, el uso de batas sanitarias para el personal necesario en el área, mantener el control adecuado de las puertas

y asegurar su apertura correcta en un sistema de dobles puertas. Además, el uso de soluciones desinfectantes en la entrada de la casa de cultivo tanto para las manos como para el calzado.

MATERIALES Y EQUIPOS

- 1- Suelo
- 2- Materia orgánica
- 3- Zeolita (granulado de 3-4 mm)
- 4- Tubetes y soporte para tubetes
- 5- Bolsas de polietileno de 1 kg
- 6- Malla de sombreo
- 7- Kit de riego con micro aspersores
- 8- Guantes
- 9- Batas sanitarias
- 10- Pala
- 11- Vagón
- 12- Tamiz
- 13- Casa de cultivo protegido, con malla que impida el ingreso de insectos y plagas
- 14- Etiquetas para plantas
- 15- Marcador indeleble
- 16- Regla o cinta métrica
- 17- Pie de rey
- 18- Solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v)

PROCEDIMIENTO

- 1- Tamizar el suelo y la materia orgánica, para eliminar las partículas gruesas, superiores a 3.0 mm.
- 2- Mezclar suelo, materia orgánica y zeolita en una proporción de 3:1:1, respectivamente y colocar en tubetes de 3.7 cm de diámetro y una altura de 14.0 cm.
- 3- Humedecer mediante riego con micro aspersores el sustrato.
- 4- Inspeccionar visualmente las plantas *in vitro* que serán transferidas para su aclimatización *ex vitro*.

Nota: Debe corroborarse que todas las plantas tengan desarrollo tanto del tallo como del sistema radical y menos 3.5 cm de longitud de tallo y de la raíz (Figura 1).



Figura 1. Plantas *in vitro* de Citrage C35 enraizadas.

5- Extraer las plantas *in vitro* de los frascos de cultivo y eliminar de forma manual los restos de medio de cultivo que puedan estar adheridos a las raíces mediante un lavado con agua corriente.

Nota: No se recomienda hacer cortes o heridas del sistema radical, para no facilitar la penetración de microorganismos patógenos del suelo.

Nota: Colocar las plantas en los tubetes y cuidar que queden extendidas las raíces a lo largo del mismo. Con esto se evita el desarrollo de deformaciones no deseadas en las raíces como los cuellos de ganso (Figura 2).



Figura 2. Plantas de Citrange Carrizo plantadas en tubetes, al inicio de la fase de aclimatización.

6- Colocar los contenedores en casa de cultivo protegido con un sombreado menor al 50% de luz solar durante las primeras dos semanas de aclimatización *ex vitro*.

Nota: Puede auxiliarse del uso de una cubierta de malla negra para garantizar el sombreado.

7- Regar diariamente con micro aspersores, por un tiempo de aproximadamente 30 minutos, en horas de la mañana (0.03 l de agua aproximadamente a cada tubete).

Nota: Debe evitarse que el sustrato alcance la capacidad de campo para evitar el exceso de humedad y la proliferación de hongos que dañan el tallo de la planta.

8- Incrementar las condiciones de iluminación hasta el 75% del total de la luz solar, pasadas las dos semanas iniciales de aclimatización, para facilitar el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Nota: A los dos meses de colocadas las plantas en estas condiciones, deben alcanzar una longitud de tallo de aproximadamente 10-12 cm, 10-12 hojas, 12-14 cm de raíz y un diámetro de tallo en un rango de 2.0-2.5 mm (Figura 3). En caso necesario, estas medidas serán tomadas auxiliándose de una regla y de un pie de rey.



Figura 3. Plantas *in vitro* de Citrange C35 a los dos meses de aclimatización en casa de cultivo protegido.

9- Transferir las plantas a bolsas de polietileno de un kilogramo de capacidad con igual sustrato y colocar en casa de cultivo protegido con condiciones de iluminación hasta el 75% de luz solar (Figura 4 A). Regar las plantas diariamente directamente a la bolsa, hasta alcanzar la capacidad de campo del sustrato. Dejar crecer las plantas en estas condiciones hasta alcanzar los caracteres deseados para el injerto (Figura 4 B).

Nota: Tener en cuenta los requerimientos establecidos en los instructivos técnicos para las plantas provenientes de semillas botánicas, referidos principalmente al diámetro del tallo superior a 5.0 mm (Jiménez *et al.*, 2017; Clemente, 2018). Para ello tomar la medida del diámetro del tallo con un pie de rey.



Figura 4. Apariencia de plantas *in vitro* de Citrange C35 a los cuatro (A) y seis (B) meses de crecimiento *ex vitro* en casa de cultivo protegido.

CULMINACIÓN DEL ENSAYO

Terminada cada etapa del protocolo, los medios y utensilios serán lavados y colocados ordenadamente en el área de trabajo dedicada para estos efectos. Los restos de medio de cultivo serán eliminados posterior a la desinfección con hipoclorito de sodio y los restos de sustratos serán colocados en áreas dedicadas a su reciclaje.

CONCLUSIONES

El protocolo que se presenta permite la aclimatización de plantas de cítricos propagadas *in vitro* en un período de 2 meses. Asegura la supervivencia de la población superior al 97%, en un estado fitosanitario y fisiológico que facilita su crecimiento activo. Se logran los parámetros para el injerto de las plantas a los seis meses de crecimiento *ex vitro* en casa de cultivo protegido. Se ha probado en plantas de *Citrus macrophylla* Wester, Citrange Carrizo y Citrange C35. Se considera puede extenderse a otros cultivares del tipo de portainjertos.

REFERENCIAS

Clemente J (2018) Tecnología de manejo en semilleros y viveros protegidos. Viveros Jagüey Grande. MINAG, Matanzas

FAO (2021) Citrus Fruit Statistical Compendium 2020, Rome

Hazarika BN, Parthasarathy VA (2002) Effects of reduced humidity and antitranspirants in acclimatizing micropropagated *Citrus* plantlets. J Appl Hortic 4(1): 30-32; doi: 10. 37855/jah. 2002. v04i01. 09

Hazarika BN, Parthasarathy VA, Nagaraju V (2002) Action of paclobutrazol in acclimatizing micropropagated citrus plantlets. Ind J Agr Res 36: 57-60

Jiménez R, Pérez F, Hernández M, Rodríguez J (2017) Evaluation of citrus interrootstocks behavior in combination with different citrus cultivars in the propagation stages. Fruticultura Tropical, La Habana

Kumar R, Kaul MK, Saxena SN, Bhargava S, Sirowa SS (2010) Acclimatization of *in vitro* generated *Citrus* plantlets. Indian J Hort 67 (Special Issue): 423-425

Rattanpal HS, Prakash O (2015) Studies on *in vitro* regeneration and acclimatization of rough lemon. Indian J Ecol 42(1): 117-121

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical por la entrega del material vegetal así como por las discusiones científicas sobre este tema.

Financiamiento: Este trabajo estuvo financiado en parte por el Programa Nacional de Producción de Alimentos y su Agroindustria a través del proyecto PN131LH001.64. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos. La decisión de publicar o la preparación del manuscrito fueron de las instituciones participantes y el colectivo de autores del proyecto.

Conflicto de interés: Los autores no declaran conflictos de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización MIO; Investigación MIO, EC, MH, LC, OH, BO, LER, NV, LR, MMR; Metodología MIO, EC, MH, LC, OH, BO; Escritura: Primera redacción MIO, BO, EC, LC; Escritura; Revisión y Edición MIO.

Disponibilidad de datos: Los datos del estudio se presentan en el artículo. Para otras consultas dirigirse a la autora para correspondencia.

María Ileana Oloriz, <https://orcid.org/0000-0002-5818-0644>

Ernesto Cárdenas, <https://orcid.org/0009-0002-1900-4274>

Marilín Hernández, <https://orcid.org/0000-0002-8082-2738>

Leniel Cuevas: <https://orcid.org/0000-0002-7653-8929>

Ortelio Hurtado, <https://orcid.org/0000-0002-1704-569X>

Bárbara Ocaña, <https://orcid.org/0000-0003-0722-3736>

Luis E Rojas, <https://orcid.org/0000-0002-0107-1842>

Novisel Veitía, <https://orcid.org/0000-0001-6357-4843>

Leonardo Rivero, <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

Milady Mendoza, <https://orcid.org/0000-0002-8946-9838>

Cómo citar:

Oloriz MI, Cárdenas E, Hernández M, Cuevas L, Hurtado O, Ocaña B, Rojas L, Veitía N, Rivero L, Mendoza-Rodríguez M (2024) Protocolo para la aclimatización de plantas *in vitro* de *Citrus* sp. Biotecnología Vegetal 24: 240207