

Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Citrus macrophylla* Wester

Leniel Cuevas¹, María I Oloriz¹, Marilin Hernández¹, Bárbara Ocaña¹, Marisol Freire-Seijo¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5 Santa Clara. Cuba CP 54830.

RESUMEN

Los cítricos (*Citrus spp.*) son importantes para la salud humana. En Cuba se redujeron las áreas del cultivo y sus producciones. Para su recuperación se necesita alta disponibilidad de semillas certificadas. La biotecnología puede contribuir a la propagación *in vitro* de patrones como *Citrus macrophylla*, principal patrón del limonero. Este trabajo se realizó con el objetivo de establecer yemas axilares de *C. macrophylla* para la propagación *in vitro* de la especie. Se utilizaron yemas axilares de plantas madre mantenidas en casa de cultivo protegido. Se determinó el tiempo de desinfección del explante con hipoclorito de sodio al 2%, (10, 20, 30 min), la influencia de la diferenciación tisular (según la ubicación en las ramas) y la influencia de la posición del explante en el medio de cultivo. El establecimiento *in vitro* de las yemas axilares se logró al desinfectar el explante con hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min, utilizando la sección B de la rama y el establecimiento *in vitro* en tubos de ensayo. Los resultados contribuyen a la propagación *in vitro* de *C. macrophylla*.

Editora:

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

*Correspondencia:
e-mail: leniel@ibp.co.cu

Recibido: 15-02-2024
Aceptado: 04-04-2024

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.

Palabras clave: cítricos, patrones, yemas

In vitro establishment of *Citrus macrophylla* Wester axillary buds

ABSTRACT

Citrus fruits (*Citrus spp.*) are important for human health. In Cuba, the cultivated area and production have decreased. A high availability of certified seeds is needed for their recovery. Biotechnology can contribute to the *in vitro* propagation of rootstocks such as *Citrus macrophylla*, the main rootstock of the lemon tree. This work was carried out with the aim of establishing axillary buds of *C. macrophylla* for the *in vitro* propagation of the species. Axillary buds from mother plants maintained in a protected greenhouse were used. The disinfection time of the explant with 2% sodium hypochlorite (10, 20, 30 min), the influence of tissue differentiation (according to the location on the branches), and the influence of the position of the explant in the culture medium were determined. *In vitro* establishment of the axillary buds was achieved by disinfecting the explant with 2% sodium hypochlorite for 20 min, using section B of the branch, and by *in vitro* establishment in test tubes. The results contribute to the *in vitro* propagation of *C. macrophylla*.

Keywords: citrus, rootstocks, buds

INTRODUCCIÓN

Los cítricos (*Citrus spp.*) son de gran importancia económica para muchos países y se encuentran entre las frutas que más se cultivan a nivel mundial (Agusti *et al.*, 2020). Posee un alto valor en la dieta de los seres humanos, pues su jugo

suministra beneficios para la salud, son fuente de vitaminas C y A, ácido fólico, potasio y calcio (Llauger, 2017; Naseer *et al.*, 2021). Cuba llegó a situarse en los primeros países en producción de cítricos a nivel mundial, con alrededor de un millón de toneladas anuales, pero las limitaciones económicas del período especial, las afectaciones por plagas y enfermedades de alto impacto y las adversidades climáticas deprimieron considerablemente sus producciones (Wang *et al.*, 2022).

De igual forma, el cultivo de los cítricos se ha visto afectado a nivel mundial por la alta incidencia de plagas y enfermedades (Hernández *et al.*, 2013). En este sentido, Zamora *et al.* (2015) afirmaron que entre las enfermedades más devastadoras en la citricultura se encuentran el *Huanglongbing* (HLB) y el Virus de la tristeza de los cítricos, los cuales son capaces de transmitirse mientras exista el vector, el agente causal o por un mal manejo del cultivo. Por ello, se hace necesario la propagación de material vegetal libre de plagas y enfermedades y el desarrollo de estrategias que contribuyan a su propagación masiva. Entre estas se encuentra el uso del cultivo *in vitro*.

En el cultivo de los cítricos se utiliza con frecuencia el injerto de variedades comerciales sobre patrones, lo que permite extender la vida útil de las plantaciones, su tolerancia a enfermedades y garantizar la calidad de los frutos (Arangren, 2009). Entre los patrones más utilizados están el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L), *Citrane carizo* (L) Osb, y *Citrus macrophylla* Wester. Este último es uno de los patrones de injertos más utilizados (Villasuso *et al.*, 2015) y su uso en la citricultura cubana se ha extendido. Cítricos como *Citrus latifolia* Ta (limón) y *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle (limas), injertados sobre este árbol dan mejores resultados en cuanto rendimiento, productividad y calidad del fruto, además de la resistencia a algunas enfermedades que dañan los patrones tradicionales de este cultivo (Zamora *et al.*, 2015). Sin embargo, su propagación por semillas demanda mayor tiempo, y presenta problemas de polinización cruzada y poliembrionia, lo cual repercute en las características de resistencia que se vuelven muy variables y trae consigo problemas sanitarios (Arias, 2013). Por tanto, se requiere de la aplicación de métodos que conduzcan a su propagación masiva en menor tiempo para aumentar las áreas de plantación. Por ejemplo, el cultivo *in vitro* constituye una de las aplicaciones prácticas más importantes de la biotecnología para la obtención de altos volúmenes de plantas a partir de un explante (Pérez, 1998).

El desarrollo de la organogénesis a partir de diferentes tipos de explantes en cítricos y su respuesta morfológica *in vitro* está influenciada por el genotipo, tipo de explante y el medio de cultivo (Barlas y Shene, 1986). En este sentido, se han empleado diferentes tipos de explantes que incluyen brotes, secciones de hojas, tallos y raíces, segmentos internodales y del epicótilo además de los cortes transversales de capas finas de células tTCL (del inglés *transverse thin cell layer*). La regeneración de los brotes adventicios se ha obtenido directamente del

explante o a partir de la formación de un callo intermedio (Carimi y Pasquele, 2003).

Entre las fases que contempla la propagación *in vitro* está el establecimiento *in vitro* del material vegetal, en la cual se hace necesario ajustar algunos factores para lograr su éxito, desde la utilización del material vegetal, medio y condiciones de cultivo adecuadas, hasta la desinfección adecuada del material vegetal. Atendiendo a la necesidad de incrementar la disponibilidad de material vegetal de *C. macrophylla* para ser utilizado como patrón, este trabajo se realizó con el objetivo de establecer yemas axilares de *C. macrophylla* para la propagación *in vitro* de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas en el período de 2022-2024.

Material vegetal

Segmentos nodales con dos yemas axilares, procedentes de plantas madre mantenidas en casa de cultivo protegido.

Frascos de cultivo

Durante el proceso del establecimiento *in vitro* de *C. macrophylla* se utilizaron dos tipos de frascos de cultivo: tubos de ensayo de vidrio (15.0 x 2.8 cm), y recipientes de polipropileno con una capacidad de volumen total de 500 ml, a los cuales se les adicionaron 10 y 60 ml de medio de cultivo, respectivamente.

Medios de cultivo

En todos los experimentos se utilizó medio de cultivo semisólido, se utilizó como agente gelificante agar E (BIOCEN), 7 g l⁻¹. El pH se ajustó a 5.7 en todos los casos.

Esterilización

Los tubos de ensayo de vidrio con el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave (LDZM-80KCS) durante 15 minutos a 121 °C y 1.2 kg cm⁻². Los platos metálicos para el manejo de los explantes, se esterilizaron en estufa 180 °C durante dos horas. El instrumental (bisturí y pinzas) se esterilizó en un esterilizador eléctrico (modelo DENT-EQ, Alemania). Los frascos de polipropileno fueron lavados con hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v) y como control químico para la contaminación microbiana se incorporaron 0.114 g l⁻¹ de Vitrofural® al medio de cultivo.

La transferencia del material vegetal se realizó en cabina de flujo laminar, previamente desinfectado con etanol al 70% (v/v).

Condiciones de cultivo

Los frascos de cultivo con el material vegetal se colocaron en cámara de crecimiento de luz solar a 25 ± 2 °C con 12-13 horas de luz e intensidad del flujo de fotones fotosintéticos de ($68.0 - 72.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) medido con un Luxómetro Extech 401025 (Extech instruments, EUA).

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda del Paquete estadístico *Statistic Packaged for Social Science* (SPSS) versión 21.0 para Windows (Microsoft®). Se emplearon las pruebas H de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para las comparaciones entre las parejas de grupos con un nivel de significación para $p\leq0.05$ al no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *C. macrophylla*

Para el establecimiento *in vitro* de yemas axilares se realizaron tres experimentos con el objetivo de determinar el tiempo óptimo para la desinfección de los explantes, la influencia de su nivel de diferenciación tisular en la brotación *in vitro* y la influencia de la posición del explante inicial en el medio de cultivo. Para ello, se tomaron ramas jóvenes de plantas madre las cuales se encontraban en casas de cultivo protegido. Previamente se les aplicó Fundasol (5 ml l^{-1}) por aspersión a que cubriera completamente el follaje y posteriormente se suspendió el riego durante cinco días. De ellas se cortaron ramas y se eliminaron las hojas y espinas con tijeras. Para estos experimentos se tomaron como explante inicial secciones natales de 3-5 cm de longitud con dos yemas cada uno.

Determinación del tiempo de desinfección de los explantes

Para determinar el tiempo de desinfección de los explantes iniciales, las secciones natales se lavaron con detergente y se enjuagaron tres veces con abundante agua. Posteriormente, en cabina de flujo laminar se colocaron en hipoclorito de sodio al 2% (v/v) y se ensayaron tres tratamientos los cuales consistían en tres tiempos de desinfección: 10, 20, 30 minutos en esta solución. Luego, se enjuagaron tres veces con agua estéril. Se realizaron 25 repeticiones por tratamiento.

En condiciones asépticas se cortaron con bisturí las secciones natales hasta reducir su longitud y mantener dos yemas. Los explantes se colocaron uno por tubo de ensayo en posición vertical. El medio de cultivo estuvo compuesto por 100% de sales MS (Murashige y Skoog 1962), 30 g l^{-1} de sacarosa y 1 mg l^{-1} de 6- Bencil amino-purina (6-BAP). Luego, los tubos de ensayo se colocaron en cámara de crecimiento de luz solar. Al séptimo día de cultivo, se cuantificó el número de explantes con presencia de contaminación microbiana visible. Los que estaban libre de contaminantes permanecieron en la cámara de crecimiento. A los 17 días fueron evaluados nuevamente, para ello se cuantificó el número de explantes con contaminación microbiana visible y el número de yemas brotadas por tratamiento. Con estos datos se calculó el porcentaje de explantes libres de contaminación microbiana visible y el porcentaje de yemas axilares brotadas.

Influencia del nivel de diferenciación tisular de los explantes en la brotación *in vitro*

Con el objetivo de determinar la influencia de la diferenciación tisular de los explantes iniciales, según su ubicación en la rama con respecto al ápice, en la respuesta *in vitro*, se cortaron ramas de plantas madre cultivadas en casa de cultivo. Las ramas se dividieron en dos secciones (sección A y sección B) a partir del ápice hacia abajo (Figura 1). Desde la yema apical hasta la hoja número siete de la rama (A) y de la hoja número ocho hasta la hoja número 16 de la rama (B). Para la preparación del explante se procedió igual que en el ensayo anterior y se empleó el tiempo de desinfección con mejor resultado. También se utilizaron iguales frascos, medio y condiciones de cultivo. Al séptimo día de cultivo, se inspeccionaron los frascos, se cuantificó el número de frascos contaminados con microrganismos y se calculó el porcentaje de ellos libres de contaminación microbiana visible. Además, se cuantificó el número de explantes vivos y se calculó la supervivencia. A los 17 días se cuantificó el número de explantes con brotes por tratamiento.

Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos transversales de las dos secciones de las ramas, en el cuarto y oncenio entrenudo tomando como inicio la yema apical. Los cortes histológicos se realizaron con una cuchilla de hoja fina y se aplicó la tinción de Pass (Ruzin, 1999). Las observaciones se realizaron en un microscopio estereoscópico con el aumento de 8x, y en el microscopio óptico con el aumento de 100x.



Figura 1. Secciones en las que fueron divididas las ramas de *Citrus macrophylla* para el establecimiento *in vitro* de yemas axilares. A) desde la yema apical hasta la hoja número siete de la rama, B) de la hoja número ocho hasta la hoja número 16 de la rama.

Influencia de la posición del explante inicial en el medio de cultivo

Este experimento se realizó teniendo en cuenta los mejores resultados de los ensayos anteriores en los que se seleccionó el tiempo de desinfección del explante y la influencia del nivel de diferenciación tisular de los explantes en la brotación *in vitro*.

En condiciones asépticas se cortaron con bisturí los segmentos nódulos (3-5 cm) con dos yemas de cada explante inicial. Se utilizaron dos tipos de frascos para ser colocados, el primero tubo de ensayo, con un explante por tubo en posición vertical (Figura 2A) y el segundo, frascos de polipropileno con volumen total de 500 ml, con cuatro explantes por frasco, en posición horizontal (Figura 2B). Para ambos casos el medio de cultivo estaba compuesto por 100% de sales MS, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 1 mg l⁻¹ de 6-BAP. Se realizaron 40 repeticiones por tratamiento. Luego de colocados los explantes en los frascos, estos fueron llevados a la cámara de crecimiento de luz solar a 25±2 °C. Al tercer día de cultivo, se inspeccionaron los frascos, se cuantificó el número de explantes sin presencia de contaminantes microbianos visibles y posteriormente se calculó el porcentaje. Dichos explantes permanecieron en la cámara de crecimiento durante 28 días hasta que los brotes alcanzaron la longitud adecuada para ser subcultivados.

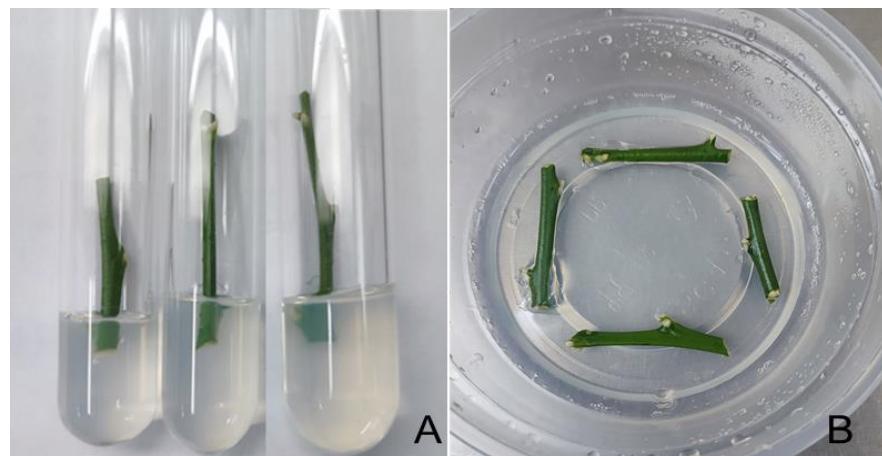


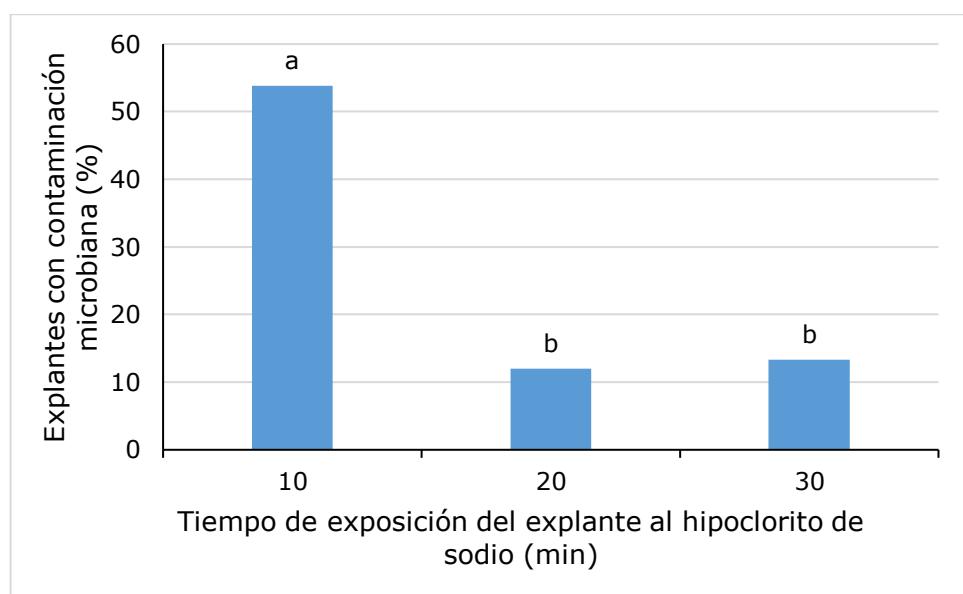
Figura 2. Explantes de *Citrus macrophylla*, en medio de cultivo para su establecimiento *in vitro*. A) Tubos de ensayo con un explante en posición vertical, B) Frascos de polipropileno con cuatro explantes en posición horizontal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del tiempo de desinfección de los explantes

El tiempo de exposición del material vegetal al hipoclorito de sodio al 2% influyó en el porcentaje de explantes libres de contaminación microbiana visible, así como el porcentaje de yemas axilares brotadas. A los siete días de cultivo en todos los tratamientos se observó crecimiento microbiano. El mayor porcentaje de contaminación se apreció en los explantes que fueron desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% durante un período de 10 minutos que ocasionó la pérdida del

53.8% del material vegetal (Figura 3). Este resultado coincidió con lo descrito por Pérez-Tornero y Porras (2008) los cuales obtuvieron pérdidas del 50% del material vegetal, al ser desinfectados en iguales condiciones. Sin embargo, con tiempos superiores se redujo la contaminación microbiana a menos del 12%.

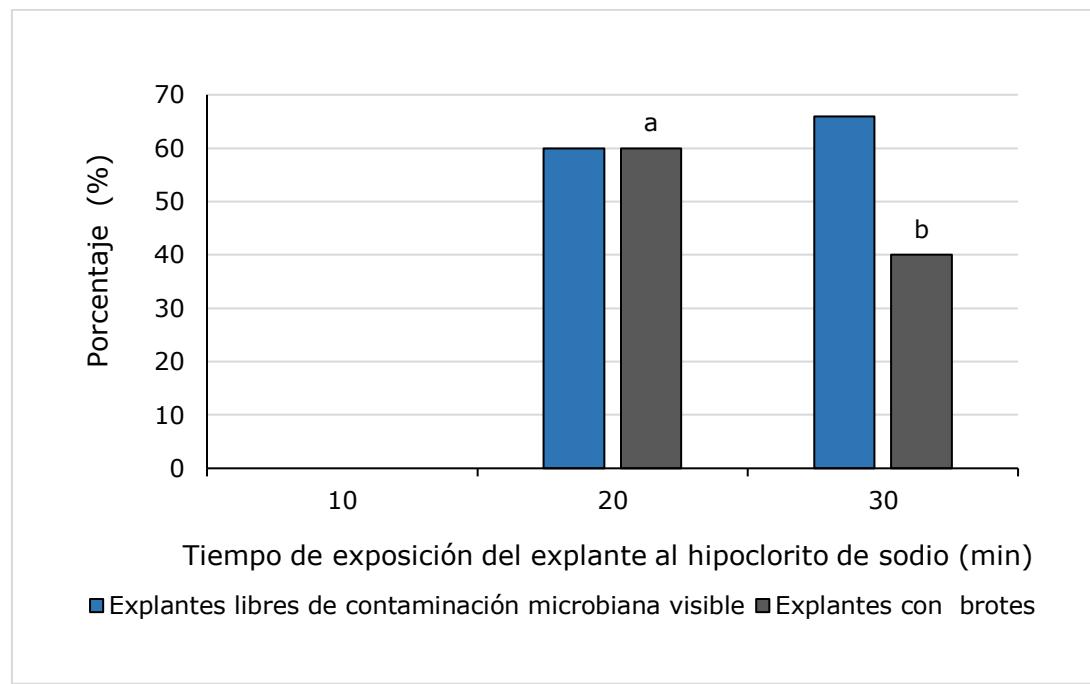


Letras no comunes sobre barras indican diferencias entre los rangos medios de acuerdo con la prueba H de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney $p \leq 0.05$. $n=25$

Figura 3. Contaminación microbiana en explantes de *Citrus macrophylla* desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%, durante diferentes tiempos de exposición a los 7 días de establecido *in vitro*.

A los 10 días de realizarse el establecimiento *in vitro* se inició la brotación de las yemas axilares, con brotes pequeños, de color verde claro y de forma asincrónica entre los explantes. En el 70% de los explantes brotaron las dos yemas y en el 30% solo una de las yemas. A los 17 días de cultivo, en el material vegetal desinfectado durante 10 minutos, todos los explantes tenían presencia de microorganismos contaminantes visibles principalmente hongos con micelio de color blanco lo que ocasionó la pérdida de todo el material vegetal (Figura 4).

No existieron diferencias significativas al desinfectar el material vegetal con hipoclorito de sodio al 2% en 20 y 30 minutos en cuanto al porcentaje de explantes libres de contaminación microbiana visible. Sin embargo, las diferencias significativas se encontraron en el número de explantes con brotes. Se observó mayor brotación en el tratamiento de 20 minutos (Figura 4 y Figura 5). La inmersión del material vegetal en hipoclorito de sodio al 2% durante de 30 min, probablemente generó estrés oxidativo y disminuyó la brotación de las yemas axilares. Este resultado coincide con lo planteado por Nikoloff (2015), que consideró que en correspondencia con la sensibilidad del tejido al desinfectante empleado, puede generarse estrés oxidativo lo que contrarresta el crecimiento, produce necrosis y muerte celular.



Letras no comunes sobre barras indican diferencias entre los rangos medios de acuerdo con la prueba H de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney $p \leq 0.05$. $n=25$

Figura 4. Influencia del tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio al 2% sobre la contaminación microbiana y la brotación a los 17 días de establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Citrus macrophylla*.



Figura 5. Brotes de *Citrus macrophylla* a los 17 días del establecimiento *in vitro* tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min.

El tiempo de exposición de 20 min resultó el mejor tratamiento para *C. macrophylla* donde se apreció alto porcentaje de explantes libres de contaminación microbiana visible y el mayor porcentaje de explantes con brotes. Este resultado coincide con lo observado por Hernández-Amasifuen *et al.* (2019) quienes obtuvieron los mejores resultados en la desinfección de segmentos

nodales de *C. aurantifolia* con hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min. Al aumentar el tiempo de exposición y la concentración del desinfectante, a pesar de que disminuyen las pérdidas por contaminación microbiana se compromete la capacidad de brotar de las yemas de estos explantes (Hernández-Amasifuen *et al.*, 2019).

Los resultados de este trabajo fueron consistentes con los obtenidos previamente por autores como Carimi y De Pasquale (2003) quienes para la desinfección de segmentos nodales de diferentes especies de cítricos, sugirieron un procedimiento que comprendió inmersión en hipoclorito de sodio 2% (v/v), Tween-20 0.05% (v/v) durante 15 minutos y lavado tres veces con agua destilada.

Con este ensayo se demostró que es importante tener en cuenta el grado de madurez del tejido, la concentración de los agentes químicos empleados y el tiempo de inmersión para lograr el mayor número de explantes establecidos *in vitro* que mantengan su vitalidad y crecimiento.

Influencia del nivel de diferenciación tisular de los explantes en la brotación *in vitro*

Los explantes tomados de la sección A (desde la yema apical hasta la hoja número siete de la rama), al séptimo día del establecimiento *in vitro* mostraron síntomas de necrosis total o parcial. Esta necrosis se inició, generalmente, por el extremo de la yema más joven hacia la base del explante (Figura 6 A). Sin embargo, los de la sección B (en el segmento desde la hoja número ocho hasta la hoja 16), los explantes se mantenían vivos, de color verde (Figura 6 B) y a los 17 días todos los explantes habían iniciado la brotación.

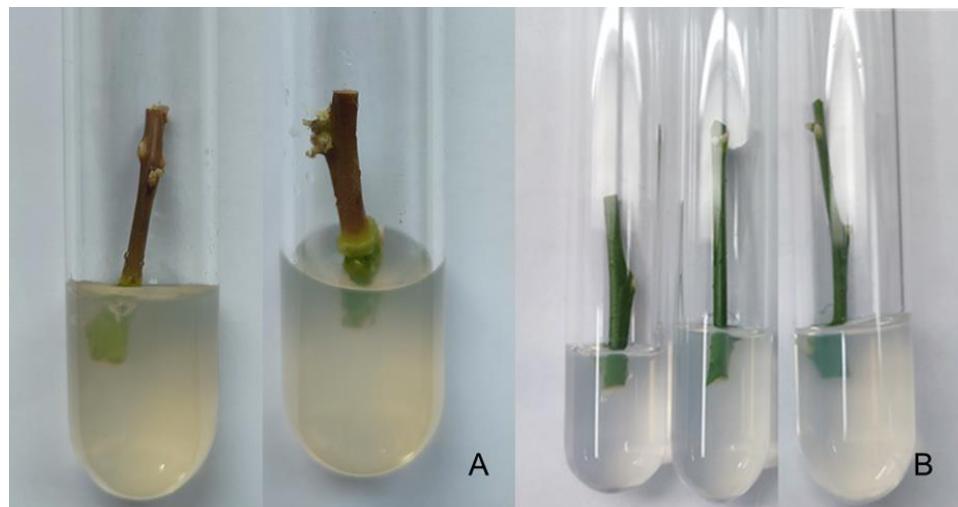


Figura 6. Explantes de *Citrus macrophylla* a los siete días de establecidos *in vitro*. Explantes que comprenden: A) segmento tomado entre la yema apical y la yema asociada a la hoja número siete, B) segmento tomado entre la yema asociada a la hoja número ocho y hasta la yema asociada a la hoja número 16.

Atendiendo a los resultados se constató que la respuesta de las dos secciones de las ramas en estudio fue diferente. Esto pudiera relacionarse con diferencias en las concentraciones de auxinas y pueden estar dado por la posición, la edad del tejido, el transporte polar y el gradiente de la diferenciación vascular (Tadeo *et al.*, 2003). El cuarto entrenudo está más cerca del ápice (zona de crecimiento donde se sintetizan auxinas) en los meristemos apicales, esto genera una mayor concentración hormonal, esencial para el proceso como la elongación celular y la inhibición de yemas laterales (Hu *et al.*, 2017). La proximidad de este entrenudo al ápice permite una mayor eficiencia en el transporte, ya que las auxinas se mueven desde el ápice hacia la base (Sun *et al.*, 2024). En este tejido se requiere mayor cantidad de auxinas para promover la formación de xilema y floema (Hu *et al.*, 2017). Mientras, en el onceno entrenudo, ubicado en zonas basales y maduras se presentan menor concentración de auxinas, debido a la distancia del ápice y a la diferenciación celular avanzada, aquí el tejido vascular ya está formado, lo que reduce la demanda de auxinas para el crecimiento primario. La energía se redirige hacia el crecimiento secundario, regulado por interacciones con citoquininas y otros reguladores del crecimiento (Garay-Arroyo *et al.*, 2014).

Los cortes histológicos transversales en los diferentes entrenudos de *C. macrophylla* indicaron diferencias en cuanto al grado de diferenciación del tejido. En el cuarto entrenudo (Figura 7 A), se apreciaron células menos organizadas que en el onceno entrenudo (Figura 7 B). Además que se observó una mayor significación del tejido en el más envejecido (onceno entrenudo).

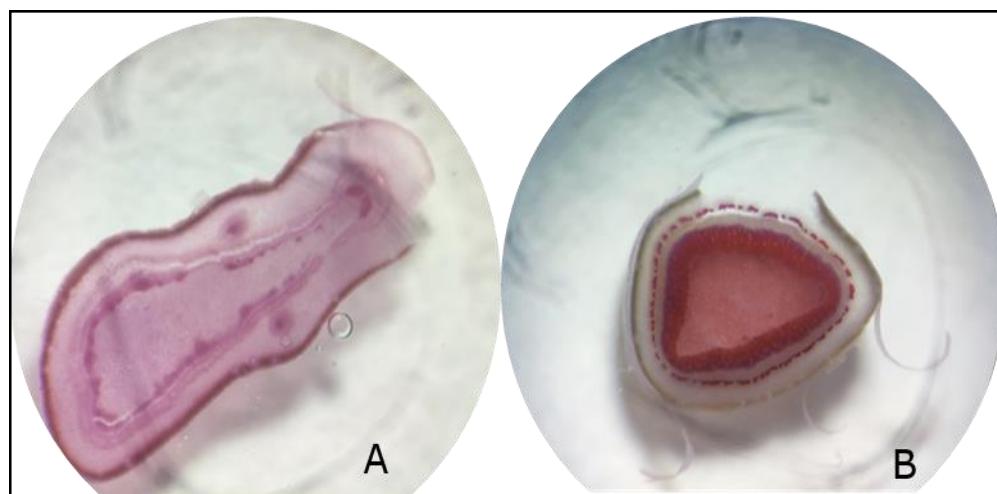


Figura 7. Sección transversal de la rama de *Citrus macrophylla* observadas en microscopio estereoscópico (8X). (A) Sección transversal del cuarto entrenudo tejido más joven, B) Sección transversal del onceno entrenudo (tejido más envejecido).

En el cuarto entrenudo desde el exterior al interior del tallo, se observó una capa de células protodérmica y una región meristemática de la que se divide el corteza y los elementos pro-vasculares, los tubos cribosos del protofloema y las traqueidas y vasos del protoxilema (Figura 8 A). Esto coincidió con lo descrito por Schneider (1968). En este tejido vegetal no están bien definidos los vasos

conductores del xilema y el floema, sino que existe una zona en formación y desarrollo de dichos vasos conductores (Figura 8 B).

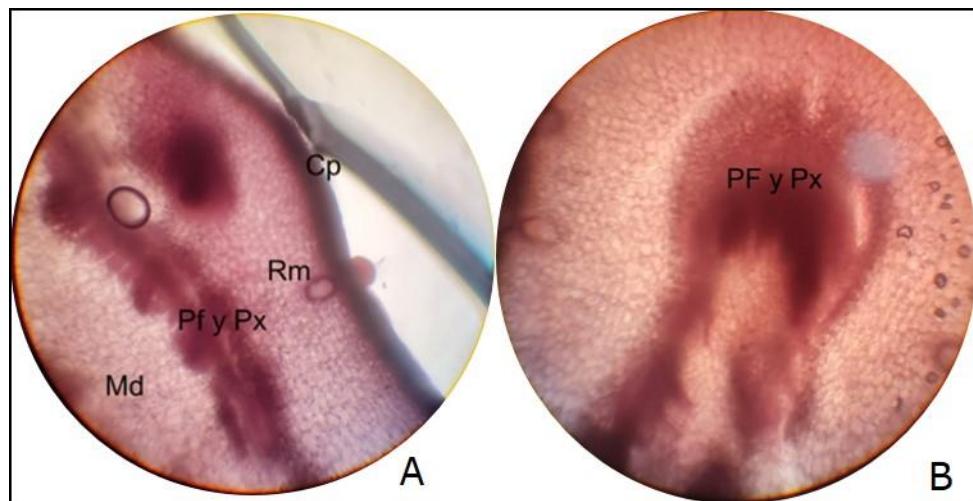


Figura 8. Sección transversal de rama de *Citrus macrophylla* en el cuarto entrenudo observado en microscopio óptico (100X). (Cp- Capa protodérmica, Rm- región meristemática, Pf Px- protofloema y protoxilema, Md- médula).

En el oncenio entrenudo el córtex ya está diferenciado completamente y se pudieron distinguir en él dos regiones en función del tamaño de sus células, una externa y otra interna. Las células del córtex externo son más pequeñas y están más densamente empaquetadas que las del córtex interno. En el tejido vascular se distingue una estrecha franja de células cambiales que han producido hacia el exterior fibras metafloemáticas insertadas en tejido parenquimático y metaxilema hacia el interior (Figura 9 A).

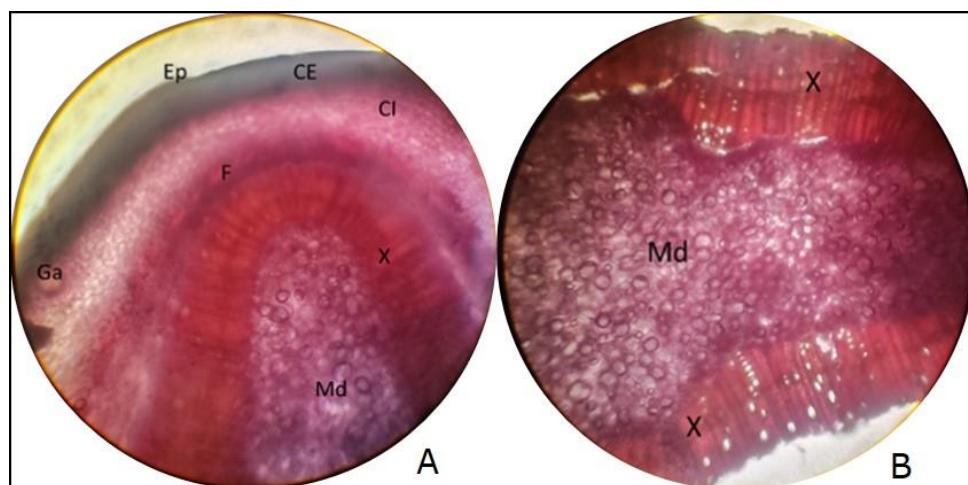


Figura 9. Sección transversal de rama de *Citrus macrophylla* en el oncenio entrenudo (100X). (Ep -epidermis, CE- córtex exterior, CI- córtex interior, Ga- glándula de aceite, F- Floema, X- xilema, Md- médula).

En el mismo tejido el análisis de los elementos conductores del xilema mostró una coloración rojo-púrpura más intensa que el cuarto entrenudo, lo que significó un grado mayor de acumulación de macromoléculas de hidratos de carbono, mayor diferenciación y desarrollo. (Figura 9B). Los resultados coinciden con el desarrollo anatómico de los tallos de cítricos descrito por Schneider, (1968) y Tadeo *et al.* (2003). Las observaciones histológicas corroboran que el nivel de organización y diferenciación observado del tejido de la zona más joven de la rama, se correspondería con la necrosis de los explantes bajo las condiciones experimentales empleadas.

Influencia de la posición del explante inicial en el medio de cultivo

A las 72 horas, se observó que solo el 20% de los explantes que fueron colocados sobre el medio de cultivo de forma vertical en tubos de ensayo tenían contaminación microbiana visible, pasados 17 días ya los explantes tenían brotes, con presencia de más de un brote por yema. Mientras los explantes ubicados de forma horizontal en los frascos de polipropileno se contaminaron el 100%, por lo que fueron retirados del experimento. Aunque la posición horizontal del explante facilita la proliferación de los brotes (Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo, 1997) en algunos cultivares, el aumento de la superficie de contacto del explante con un medio de cultivo rico en nutrientes, principalmente la sacarosa como fuente de carbono, favorece el crecimiento de los microrganismos contaminantes, sobre todo cuando el material vegetal a introducir proviene de un ambiente *ex vitro*. En este sentido, Prakash y Sharma (2018) consideraron que el establecimiento *in vitro* y la regeneración de los explantes pueden ser afectados por varios factores como el fotoperiodo, el tipo de recipiente de cultivo, la orientación del explante, los reguladores de crecimiento utilizados, el tipo de explante, entre otros.

La multiplicación de plantas de cítricos por esta vía permite mantener la estabilidad genética, Duran-Vila *et al.* (2008) advirtieron que aunque las yemas axilares son más estables, factores como el estrés oxidativo, o el mal manejo de los explantes puede afectar la propagación.

CONCLUSIONES

Pueden establecerse *in vitro* yemas axilares de *Citrus macrophylla* al emplear hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min para su desinfección, utilizar el fragmento de la rama comprendido entre la hoja ocho a la 16, y colocarlo en tubos de cultivo hasta obtener brotes de un tamaño mínimo de 1.5 cm para su multiplicación.

REFERENCIAS

- Agustí M, Mesejo C, Reig C, Martínez-Fuentes A, Zaragoza S, Primo-Millo E (2020) El tamaño del fruto en los cítricos. Levante Agrícola (451): 57-67
- Arangren M (2009) Pronóstico de madurez y otra especificaciones de calidad para el ordenamiento de la cosecha de los cítricos de Jaguey Grande. Fruticultura Tropical 2(1): 115

Arias RM (2013) Efecto del enraizante del humus de lombriz en propagación por estacas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*), Citrumelo (*Citrance citrumelo*) y lima (*Citrus limonia*) para la obtención de árboles madres en el municipio de Coroico. Tesis de pregrado, Universidad mayor de San Andrés, Bolivia

Barlass M, Skene K (1986) Citrus (*Citrus* spp). Biotechnology in Agriculture and Forestry 1(1): 207-219

Carimi F, De Pasquale F (2003) Micropropagation of citrus. En: Jain M, Ishji K (Eds). Micropropagation of woody trees and fruit, pp. 589-619. Kluwers Academic Publisher, Dordrecht

Duran-Vila N, Ortega V, Navarro L (2008) Genetic stability of citrus somatic embryos and regeneration of acclimated plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 94(1): 23-32

Hernández-Amasifuen AD, Pineda-Lazaro A, Díaz-Pillasca H (2019) Micropropagación *in vitro* de naranja agria (*C. aurantium* L.) a partir de segmentos nodales. Bionatura 6(4): 88-95

Hernández Y, Silva J, Borges M (2013) Establecimiento y multiplicación *in vitro* de (*Citrus aurantifolia*) Christm. Swing. var. Mexicana a partir de semillas. Biotecnología vegetal 13(5): 181-187

Hu W, Fagundez S, Katin L (2017) Endogenous auxin and its manipulation influence *in vitro* shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. Horticulture Research 4(17): 1-6

Garay-Arroyo A, Sánchez M, García-Ponce B, Álvarez-Buylla E (2014) La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Revista de educación bioquímica 15(9): 93-98

Llauger R (2017) La Fruticultura: su contribución a la seguridad alimentaria y nutricional y al desarrollo sostenible. Instituto de Fruticultura Tropical, La Habana

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapad grow and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(2): 473-497

Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T, Bhat TA (2021) Citrus fruits-Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. En: Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T, Bhat TA (Eds). Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas. Springer, Cham, Dordrecht; doi: 10.1007/978-3-030-75502-7-18

Nikoloff N (2015) No siempre sale todo bien, Problemas de Cultivo de Tejidos Vegetales. En: Sharry S, Adema M, Abedini W (Eds). Plantas de Probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*, pp. 102-111. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (EDULP), Buenos Aires

Pérez-Molphe-Balch E, Ochoa-Alejo N (1997) *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. HortScience 32(8): 931-934

Pérez-Tornero O, Porras I (2008) An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus lemon* L.) from nodal explants. *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 95(6): 257-264

Pérez R, Galiana A M, Navarro L, Duran-Vila N (1998) Embriogenesis *in vitro* of several citrus species and cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73(3): 796-802

Prakash S, Sharma S (2018) Micropropagación de cítricos. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(4): 1513-1517

Ruzin SE (1999) Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York

Schneider H (1968) The anatomy of citrus. *The citrus industry* 2(1): 1-85

Sun Y, Chen J, Yuan Y, Jiang N (2024) Auxin efflux carrier PsPIN4 identified through genome-wide analysis as vital factor of petal abscission. *Frontier* 15(2): 32-40

Tadeo F, Moya JL, Iglesias DJ, Talón M, Primo-Millo E (2003) Histología y citología de cítricos. Generalitat Valenciana Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, Valencia

Villasuso RS, Campo FP, Zaldivar MRH, Palenzuela BV, Clemente J, Calvo A (2015) Caracterización y evaluación del género *winglea glutinosa* (Blanco) Merr como un posible patrón en combinación con diferentes cultivares de cítricos en la etapa de propagación en Cuba. *Agrotecnia de Cuba* 39(2): 3-19

Wang Z, Sui Y, Li J, Tian X, Wang Q (2022) Biological control of postharvest fungal decays in citrus: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(4): 861-870

Zamora V, Peña I, Marchena X, Hernández L (2015) Uso del microinjerto *in vitro* de ápices caulinares para eliminar *Candidatus liberibacter asiaticus* en cultivares de cítricos en Cuba. *Protección Vegetal* 30(2): 123-132

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional Producción de Alimentos y su Agroindustria a través del proyecto PN131LH001.64.

Financiamiento: La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Oficina de Gestión de Fondos y Proyectos Internacionales del CITMA bajo el código del proyecto PN131LH001.64.

Conflictos de interés: Los autores no declaran conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización MIO, LC, MFS; Investigación MIO, LC, MFS, MH, BO; Metodología MIO, LC, MFS, MH, BO; Escritura: Primera redacción LC; Escritura; Revisión y Edición MIO, LC.

Disponibilidad de datos: Los datos del estudio se presentan en el artículo. Para otras consultas dirigirse al autor para correspondencia.

Leniel Cuevas, <https://orcid.org/0000-0002-7653-8929>
María Ileana Oloriz, <https://orcid.org/0000-0002-5818-0644>
Marilín Hernández, <https://orcid.org/0000-0002-8082-2738>
Bárbara Ocaña, <https://orcid.org/0000-0003-0722-3736>
Marisol Freire-Seijo, <https://orcid.org/0000-0002-1962-2809>

Cómo citar:

Cuevas L, Oloriz María I, Ocaña B, Freire-Seijo M (2024) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Citrus macrophylla* Wester. Biotecnología Vegetal 24: 240715