

Ensayo de investigación

Avances y limitantes en la micropropagación del limón persa (*Citrus × latifolia* Tan.)

Recibido: 10-01-2020 Aceptado: 19-11-2020 (Artículo Arbitrado)

Resumen

La micropropagación es una alternativa viable a la propagación convencional de limón persa, pudiendo resolver los problemas fitosanitarios que se presentan, además de complementar a las pocas plantaciones que existe a nivel nacional, no obstante, para este híbrido se han encontrado muy pocos registros en la literatura al respecto, en contraste a lo disponible para otras variedades de cítricos. En los trabajos realizados en limón persa se ha hecho el uso de 6-Bencilaminopurina (BAP) para la inducción de brotes adventicios vía organogénesis directa, utilizando segmentos nodales e internodales. Sin embargo, éstos han sido ineficientes en la cantidad de brotes generados, obteniéndose resultados repetitivos en los diferentes reportes que existen en cuanto al número de brotes obtenidos; por otra parte, en portainjerto de cítricos se observó el uso de combinaciones de diversos reguladores del crecimiento vegetal, obteniendo resultados de hasta 8 brotes por explante. Esto último resulta relevante y serviría como base para la micropropagación de limón persa.

Abstract

Micropropagation is a viable alternative to the conventional propagation of Persian lime, solving the phytosanitary problems that arise while also complementing the few plantations that exist nationally. However, very few records were found in the literature for this particular hybrid in contrast to what is available for other varieties of citrus. In the studies carried out on Persian lime, 6-benzylaminopurine (BAP) has been used for the induction of adventitious shoots by direct organogenesis, using nodal and internodal segments. However, this method has proved inefficient with regard to the number of shoots generated, obtaining similar results to the different reports that exist regarding the number of shoots obtained. On the other hand, the use of combinations of various plant growth regulators was observed in citrus rootstocks, obtaining results of up to 8 shoots per explant. This last approach is relevant and would serve as the basis for the micropropagation of the Persian lime.

Résumé

La micropropagation est une alternative viable à la propagation conventionnelle du citron persan, étant capable de résoudre les problèmes phytosanitaires qui se posent, en plus de compléter les quelques plantations qui existent à l'échelle nationale, cependant, pour cet hybride, très peu de signalements ont été trouvés dans la littérature sur le sujet, contrairement à ce qui est disponible pour d'autres variétés d'agrumes. Dans les études menées sur le citron persan, la 6-benzylaminopurine (BAP) a été utilisée pour l'induction de pousses adventives par organogénèse directe, en utilisant des segments nodaux et internodaux. Cependant, ceux-ci ont été inefficaces dans le nombre de pousses générées, obtenant des résultats répétitifs dans les différents rapports qui existent concernant le nombre de pousses obtenues; en revanche, dans le porte-greffe d'agrumes, l'utilisation de combinaisons de divers régulateurs de croissance des plantes a été observée, obtenant des résultats allant jusqu'à 8 pousses par explant. Ce dernier est pertinent et servirait de base à la micropropagation du citron persan.

Marco Antonio Méndez Jiménez¹
José Humberto Caamal Velázquez^{1*}
Norma Laura Rodríguez Ávila²
Arely Anayansi Vargas Díaz¹
Juan Carlos Alamilla Magaña¹
María Asunciona Criollo Chan¹

Palabras clave: Cítricos, fitohormona, micropropagación, organogénesis directa.
Keywords: Citrus, phytohormone, micropropagation, direct organogenesis.
Mots-clés: Agrumes, phytohormone, micropropagation, organogénèse directe.

Introducción

El limón persa (*Citrus × latifolia* Tan.), conocido también como lima de Tahiti, limón pérsico o limón sin semilla (Osorio-Mora y Zacarías, 2000) es perteneciente a la familia de las Rutáceas; es de origen tropical y considerado entre los más rentables. Su centro de origen exacto es desconocido, sin embargo, se considera un híbrido entre el limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) y el citrón (*Citrus medica* Linn) (Rouiss et al., 2018). Gran parte de la producción de limón persa es destinado a la industria, para la elaboración de concentrados, complementos ali-

¹Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales - Colegio de Postgraduados campus Campeche

²Instituto Tecnológico de Chiná

Correspondencia:
*hcaamal@colpos.mx

menticios, bebidas, obtención de aceites esenciales, terpenos y ácido cítrico; por otro lado, las flores son aprovechadas por la especie *Apis mellifera* para la producción de diversos productos como miel, cera y propóleo (Milla et al., 2009, Martell-Tomanis et al., 2019). Los principales productores a nivel mundial son: México, Unión Europea, Argentina, Turquía, Estados Unidos, Sudáfrica e Israel, donde la producción no abastece el consumo de la población (USDA/FAS, 2020).

En México, el limón persa ha adquirido una enorme importancia económica durante los últimos años; ocupando el primer lugar como productor de fruta fresca, con una producción de 1,325,385.03 toneladas cosechadas en 93,633.69 hectáreas, con un rendimiento promedio de 14.16 ton/ha (SIAP, 2020). Esto debido a que los cítricos son capaces de crecer y fructificar en condiciones ambientales muy diversas, desde climas subtropicales relativamente fríos hasta zonas tropicales (Franck-Curk et al., 2016).

Principales enfermedades del limón persa

Uno de los aspectos de mayor importancia para el éxito de una producción de cítricos, es la selección adecuada de los portainjertos (Curti-Díaz et al., 1996); sin embargo, existen diversos factores, tanto bióticos como abióticos que afectan la producción de cítricos, los cuales incluyen la sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas. Además, por ser un cultivo permanente y como cualquier especie bajo condiciones de monocultivo, presenta un elevado grupo de macro y microorganismos, que pueden ser benéficos, parásitos o conducir al desarrollo de plagas y enfermedades, causadas principalmente por bacterias, hongos y virus; estos últimos han tenido gran repercusión en las distintas zonas de producción.

Por ejemplo, el virus de la tristeza de los cítricos (VTC) es una de las enfermedades que afecta generalmente a todas las especies de cítricos en el mundo (Rocha et al., 1995, 1998). El VTC es transmitido por yemas y material contaminado, aunque también se propaga de manera semipersistente por medio de varias especies de áfidos, principalmente *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) que es el más eficiente para la transmisión de cepas severas (Méndoza et al., 2005). Para el control de esta enfermedad se requiere de la implementación de programas de saneamiento, cuarentena y certificación del material de propagación

(Lee et al., 2009). Chaparro-Zambrano et al., (2013) demostraron que los injertos de limón persa sobre varios híbridos de cítricos decayeron en un periodo de 7 años debido al deterioro del vigor de las plantas causados por los daños de VTC.

Quiroga et al., (2010) demuestran que la incidencia de VTC sobre plantas de limón persa injertadas en *Citrus reticulata* Blanco fue de un 16.5% durante el primer año, alcanzando el 100% al paso de 5 años, momento en el que las plantas presentaban síntomas visibles de la enfermedad.

Generalmente, las plantas que se encuentran con un alto grado de infección demuestran deterioro, lo que resulta en la disminución de su rendimiento y productividad, afectando con el paso del tiempo el sistema vascular, conduciendo posteriormente a la muerte.

De la misma manera, otra de las enfermedades a la que se le atribuye pérdidas de cultivo es el HLB, detectado por primera vez en el 2009 en Tizimín, Yucatán, en plantas de traspatio (Hernández et al., 2014); este se encuentra ampliamente distribuido por todo el continente americano (Bove, 2006). El HLB está asociado a *Diaphorina citri* un insecto plaga vector de la bacteria *Candidatus liberibacter*, causante de dicha enfermedad. Este insecto, de recién ingreso al país, tiene una amplia distribución en todos los estados donde se cultivan los cítricos en México.

Aunado a esto, el cultivo también se ve afectado por malezas que compiten por agua, nutrientes y luz, dependiendo del estadio de las plantas (González y Tullo, 2019); al igual que las plagas y enfermedades son tratadas a través de los diversos paquetes tecnológicos, considerando el tamaño de la maleza, humedad del suelo, y recursos disponibles del productor (INIFAP, 2017). De la misma manera que para el VTC, la forma de controlar la enfermedad es mediante una buena elección del injerto, estrategia con la que actualmente se controla estas enfermedades. Sin embargo, la propagación del limón persa es a través de estacas y no está exento de contaminaciones por las labores culturales de la propagación. A pesar de existir viveros certificados libres de plagas y enfermedades, una gran cantidad de productores no acude a estos, debido a los costos de la planta y a la cobertura de los mismos en todo el país.

Propagación convencional del limón persa

Debido a la limitante en la carencia de la semilla, su reproducción se realiza de manera asexual, exclusivamente mediante injertos sobre patrones provenientes de semilla; para ello se usan yemas que se obtienen de varetas procedentes de árboles madre altamente productivos, que se injertan sobre portainjertos apropiados para obtener plantas que luego se llevan a campo (Milla et al., 2009).

Este tipo de propagación requiere de una gran superficie, obteniéndose resultados tras periodos largos de tiempo, además de presentar limitantes en algunas épocas del año y la obtención de semilla patrón adecuada. En la mayoría de los casos, los portainjertos tienden a un origen apomítico, influyendo sobre más de 20 características de la variedad injertada tales como: rendimiento, longevidad, absorción de nutrientes, tamaño, forma, color, calidad interna y externa del fruto, tolerancia a enfermedades, y adaptación a condiciones de suelo y clima (Davies y Albriego, 1994).

Dentro de los principales portainjertos usados para la propagación de cítricos se encuentran; Mandarina Cleopatra, Citruelo Swingle, Citrus Volkameriana, entre otros que se enlistan en la tabla 1. Estos patrones producen plantas más vigorosas, con un alto rendimiento durante un periodo prolongado, además de que inducen resistencia a VTC, Xiloporosis, Psorosis, Exocortis y Gomosis; principalmente, el Citruelo

Swingle provoca resistencia a *Phytophthora* spp., puesto que, presenta un sistema radicular resistente más desarrollado (Rodríguez et al., 2002).

No obstante, en México comúnmente el portainjerto más utilizado es el naranjo agrio (*Citrus aurantium*), puesto que se desarrolla adecuadamente sobre suelos con poca fertilidad, densos y con poco drenaje; acoplándose a suelos con alto pH y, alta alcalinidad, siendo medianamente tolerante al frío (Curti-Díaz et al., 2012).

La Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002, establece que todo el material a utilizar para transporte o siembra de cítricos debe provenir de material libre de enfermedades, incluyendo al portainjerto, debido a que es considerado un factor importante durante las primeras fases del establecimiento del cultivo, por las cual se requiere la utilización de material registrado y certificado. Una de las problemáticas de esta medida es la disponibilidad de semillas, siendo relativamente baja, además de no poder conseguirse en cualquier época del año. Las semillas se pueden conservar con un 90% de viabilidad, con una humedad máxima del 6% y una temperatura del 4 °C por un periodo máximo de 32 meses; sin embargo, la viabilidad se pierde muy rápido después de su transporte, aunque cabe destacar que depende del tipo de portainjerto que se trate. Debido a estas problemáticas, una herramienta biotecnológica a utilizar es la micropropagación, que puede tener la ventaja

Tabla 1. Portainjertos de cítricos y sus características más importantes. Información tomada de (Rodríguez et al., 2002).

Portainjerto	Influencia sobre el injerto ¹			Adaptabilidad edafoclimática ²						Tolerancia a enfermedades ³			
	P. V.	Produc.	Cal. Frut.	Frio	S. A.	Sequías	Salinidad	S. Ar.	VTC	E	G	P	C
Citrange Troyer	Media	Media	Media	NR	Sí	No	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Citrange Carrizo	Media	Media	Media	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí
C-35	NR	Media	Alta	No	NR	Sí	NR	NR	Sí	NR	NR	NR	NR
Limon Volkameriano	NR	Alta	Media	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Lima Milam	NR	Media	Media	No	NR	NR	NR	NR	Sí	Sí	NR	NR	NR
Lima Rangpur	Alta	Alta	Alta	NR	NR	Sí	Sí	NR	Sí	No	No	Sí	NR
Mandarina Cleopatra	Media	Bajo	Alta	No	Sí	NR	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Trifoliado Rubidoux	Alta	Alto	Alto	NR	NR	NR	NR	NR	Sí	No	No	No	No
Naranjo Agrio	Media	Alto	Alto	Sí	No	NR	Sí	NR	No	Sí	NR	Sí	Sí
Mandarina Sunki	Baja	Media	Alta	NR	NR	No	NR	Sí	Sí	No	NR	NR	NR
Citrumelo Swingle	Alta	Alta	Alta	NR	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Citrus Amblycarpa	Media	Media	Media	NR	NR	NR	Sí	NR	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Citrus Macrophylla	Alta	Alta	Alta	NR	Sí	Sí	Sí	NR	No	Sí	NR	NR	NR

¹Influencia sobre el injerto: PV= planta vigorosa, Produc= productividad y Cal. Frut= Calidad del fruto

²Adaptabilidad edafoclimáticas: SA= Suelos arenosos y S. Ar= Suelos arcillosos.

³Tolerancia a enfermedades: VTC= Virus de la tristeza, E= Exocortis, G= Gomosis, P= Psorosis y C= Cachexia.

de disminuir los costos de producción, obteniéndose material vegetal libre de plagas y enfermedades, por lo menos con un 20 % menos del costo de la semilla y con disponibilidad de material vegetal en cualquier época del año.

Micropropagación del limón persa

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) involucra diferentes técnicas, como cultivo de órganos o células vegetales. Consiste en regenerar plantas a partir de ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen, cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica (*in vitro*) (Cedrés et al., 2015), permitiendo obtener una gran cantidad de plantas a partir de una sola. Las plantas que resultan propagadas son idénticas a la planta madre y entre sí, en otras palabras, son consideradas como clones (Loyola-Vargas et al., 2008). No obstante, la mayoría de las técnicas de micropropagación han sido aplicadas a especies de plantas ornamentales y en herbáceas con relativa facilidad y éxito. Sin embargo, se requieren mayores esfuerzos para que las aplicaciones de las técnicas de cultivo *in vitro* sean un éxito para especies leñosas, dentro de las que se encuentran los cultivos de cítricos y en especial el limón persa (Vega-Pérez et al., 1997).

Debido a que el limón persa generalmente se propaga mediante injertos por no poseer semillas, la micropropagación presenta una alternativa valiosa a la propagación tradicional; puesto que puede desarrollarse a partir de una amplia gama de explantes vegetales como: secciones de tallo, raíz, meristemas radicales, brotes, puntas de brotes y secciones foliares (Singh, 2002). En cítricos se recomienda el uso de explantes de plantas juveniles para una rápida proliferación, pero estos demuestran diferentes características indeseables propias del estadio, pues se necesita largos periodos de tiempo para entrar en producción (Pérez-Tornero et al., 2010); aunado a esto, la ausencia de árboles juveniles adultos limita la obtención del material vegetal, así como su establecimiento *in vitro* exitoso (Bonga, 1982). Se ha registrado poca información para la propagación *in vitro* de limón persa; los datos más abundantes en relación a este tema están relacionados con sus portainjertos; por

ejemplo, en plantas de naranjo agrio (*C. aurantium*), citrange carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. *X Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y mandarina cleopatra (*C. reshni* Hort. Ex Tanaka), mediante las técnicas de cultivo de tejidos se ha obtenido homogeneidad y un número de brotes de 2, 3 y 7.3, utilizando como fuente de explantes segmentos internodales respectivamente (Vega-Pérez et al., 1997), así como el uso de reguladores de crecimiento vegetal que promueven su desarrollo induciendo la división celular específica.

En la micropropagación de limón persa únicamente se han registrado cinco estudios, en los cuales se ha intentado micropropagar mediante organogénesis directa. Por ejemplo, en un estudio realizado por Pérez-Luna et al., (2013 y 2015), desarrollaron 4 experimentos; evaluando combinaciones de distintos reguladores del crecimiento vegetal, como AIA (Ácido Indol Acético), ANA (Ácido Naftalanacético), BAP (6-Bencilaminopurina), adenina, sulfato de adenina, 4-FAA (ácido 4-fluorofenoxiacético) y TRIA (1-Triacontanol), en segmentos nodales e internodales para la inducción de brotes adventicios; lograron obtener hasta 4 brotes por explante utilizando 1 mg L⁻¹ de BAP. Sin embargo, después de un mes de cultivo, los explantes presentaban defoliación en un 22% y el 28% presentaba callo, lo que evitaba la organogénesis directa en los segmentos nodales. Con el fin de eliminar el proceso de defoliación de los explantes se utilizó nitrato de plata. En la figura 1 podemos observar los principales resultados de Pérez-Luna et al., (2013).

Otro estudio fue, el realizado por Herrera-Flores et al., (2017) en el que introdujeron segmentos nodales de limón persa, con el fin de obtener un protocolo para el establecimiento del mismo bajo condiciones de cultivo *in vitro*, y su posterior propagación masiva en sistemas de inmersión temporal. Se obtuvo un bajo porcentaje de asepsia, con un 34% de explantes asépticos, de estos explantes realizaron una dosis respuesta de una auxina y una citocinina y se logró el 42% de explantes de brotación, reportando la combinación de 1 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA a los 15 días después del establecimiento. Sin embargo, presentó defoliación de los explantes. Para poder disminuir esta defoliación se empleó un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) del tipo de frascos gemelos modificado; bajo este esquema, se logró obtener un promedio de 1.2 brotes por explante, obteniéndose

explantes de mejor calidad. En la figura 2 podemos observar una fotografía de los explantes sembrados en medio semisólido y en medio líquido en los SIT de frascos gemelos.

Por otro lado, Zamora-Rodríguez et al., (2016) usaron la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares, con el objetivo de eliminar *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa, utilizando *Citrus macrophyla* Wester como portainjerto. De la misma manera, Varela-Gonzales (2015) utilizó la técnica de microinjertos de ápices caulinares de limón persa sobre *Citrange troyer* y *Citrus volkameriana*. Sin embargo, los microinjertos solo consideran la brotación de los ápices o yemas axilares y su injerto posterior en los portainjertos, de hecho, los protocolos de propagación reportados se centran en los portainjertos.

En un estudio realizado por Méndez-Jiménez et al., (datos sin publicar, 2018) con la finalidad de establecer segmentos nodales de limón persa *in vitro*, utilizaron extractos metanólicos de *Hibiscus sabdariffa*, *Cinnamomun zeylanicum*, *Ruta graveolens* y *Thymus vulgaris*, adicionados al medio de cultivo semisólido a concentraciones de 0.1%, logrando obtener 20% de explantes asépticos en el extracto de jamaica y 10% en el extracto de canela. Los demás explantes presentaron una contaminación bacteriana excesiva a las 24 h y por hongos a las 48 h. Al mismo tiempo

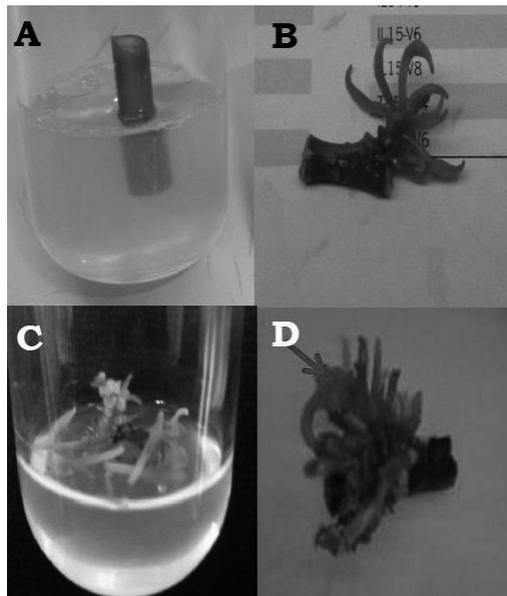


Figura 1. Explantes de limón persa en medio MS con BAP combinado con ANA y/o AIA. **A)** Segmentos internodales con BAP 2 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹; **B)** Brote axilar con BAP 1 mg L⁻¹; **C)** Brote axilar con BAP 2 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹ con problemas de senescencia foliar; **D)** Brote axilar con BAP 4 mg L⁻¹ con formación de callo con consistencia gelatinosa en la base del explante. **Fuente:** Pérez-Luna et al., 2013.

que se mantenían contaminados, los explantes se iban fenolizando y finalmente morían (Figura 3A). En el mismo experimento emplearon la combinación de 2 reguladores del crecimiento vegetal (BAP y ANA) a concentraciones de 0.5 mg L⁻¹ respectivamente y los explantes que no presentaron contaminación lograron la inducción de brotes en un periodo de 15 días después del establecimiento del cultivo (Figura 3B). No obstante, en 6 días los brotes presentaron problemas de defoliación, así como necrosis parcial y total del explante original (Figura 3C), lo que concuerda con lo descrito con Pérez-Luna et al., (2013), además de la formación de callo sin la capacidad de generar una nueva planta (Figura 3D).

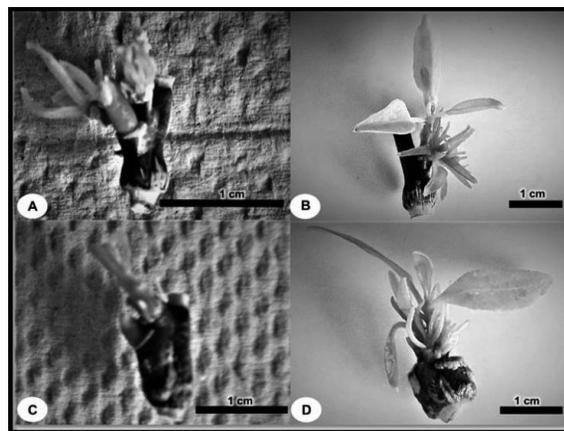


Figura 2. Características de los brotes obtenidos en medio semisólido (A y C) y en sistema de inmersión temporal (B y D). **Fuente:** Herrera-Flores et al., 2017.

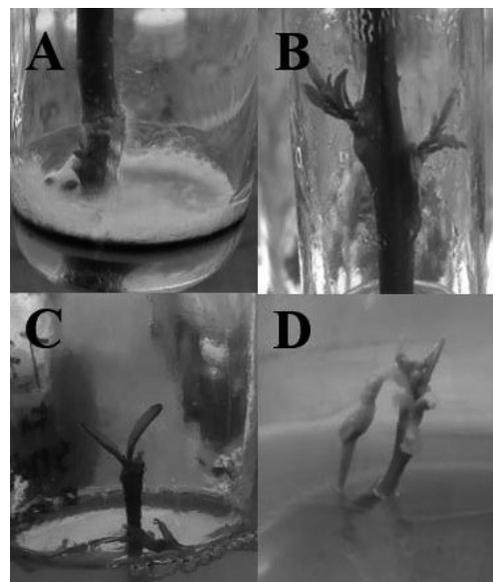


Figura 3. Explantes de limón persa *in vitro* con (A) contaminación, (B) brotes adventicios, (C) problemas de defoliación, (D) presencia de callos. **Fuente:** Méndez-Jiménez (datos sin publicar, 2018)

En un segundo experimento, Méndez-Jiménez et al., (datos sin publicar, 2018) hicieron uso de la combinación del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* y *Cinnamomun zeylanicum* aplicándolos al medio de cultivo semisólido a concentraciones de 0.5% respectivamente, además de la combinación de BAP y ANA, ambos a concentraciones de 0.5 mg L⁻¹. A las 96 horas después del establecimiento del cultivo se registró la presencia de contaminación fúngica únicamente, presentándose en la parte del explante que no se encontraba en contacto con el medio de cultivo, mientras que en la parte que se encontraba en contacto con el medio de cultivo no se observó ningún tipo de contaminación. Cabe resaltar que la contaminación provino de las partes donde se encontraban las yemas y donde se realizaron los cortes de los explantes. (Figura 4A). Por otra parte, se registró la presencia de callo a los 2 días posteriores a la siembra; sin embargo, el explante se vio afectado por la contaminación y no dio indicios de formar una nueva planta (Figura 4B).

Dado que los reportes de micropropagación se encuentran en los patrones, se presenta un resumen de algunos reportes de propagación de los mismos, con el fin de aportar una base para la propagación de limón persa (Ver la Tabla 2). Como se puede observar, en la mayoría de los estudios se utilizó la citoquinina BAP, a una concentración máxima de 6 mg L⁻¹ con una tasa de brotación de 2-3 brotes por explante. La mayor cantidad de inducción de brotes (9 brotes/explante) se reporta en *C. aurantifolia* Christm. Swing en un periodo de 8 semanas utilizando la combinación de hormonas BAP (2 mg L⁻¹), Kinetina (1 mg L⁻¹) y ANA (1 mg L⁻¹), seguida de la combinación hormonal de AG₃ (1 mg L⁻¹) y BAP (2 mg L⁻¹) con una tasa de brotación de 8.6 brotes/explante en la misma especie, siendo estos dos protocolos promisorios para su empleo en la propagación de limón persa.

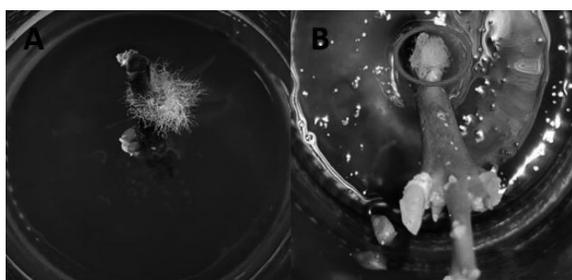


Figura 4. Contaminación fúngica originario de las zonas cortadas de los explantes y sin contacto con los extractos (A). Presencia de callo y afectado por la contaminación fúngica (B).
Fuente: Méndez-Jiménez (datos sin publicar, 2018).

Conclusiones

Tal como este ensayo lo ha demostrado, la propagación convencional de limón persa se ve afectada, ya que la tasa de reproducción es baja, y las plantas no cumplen con los estándares establecidos por SENASICA en la NOM-079-FITO 2002. A pesar de que la micropropagación suele ser una alternativa viable frente a la propagación convencional, considerando que son cultivadas en condiciones controladas, en esta especie no suele ser del todo factible, debido a que los explantes se han visto afectados especialmente por microorganismos, limitando su desarrollo. Además, no existe un protocolo de desinfección establecido para la obtención de explantes asépticos, aunado a esto, los brotes que se logran obtener presentan problemas de defoliación, y a pesar de que se ha reportado que esta problemática se puede controlar mediante la aplicación de AgNO₃, la longitud del brote no se desarrolla adecuadamente para ser utilizado como fuente de explantes. Este hecho ha conducido a la búsqueda de alternativas que minimicen la presencia de microorganismos y de las sustancias oxidantes, tales como antioxidantes, adsorbentes o técnicas basadas en el intercambio gaseoso del sistema, como el uso de BIT, que eliminan las sustancias oxidantes acumuladas mediante la renovación de la atmósfera. Por tanto, la ventilación es una estrategia que debe considerarse para incrementar la producción de biomasa, pues influye en la asimilación de nutrientes, eliminación de gases como el etileno, ácido abscísico y el CO₂, los cuales llegan a ser tóxicos en el cultivo *in vitro* convencional. En relación a lo mencionado y con base a la revisión previa, es de destacarse que la micropropagación de limón persa no ha sido efectiva desde el establecimiento del cultivo. Lo anterior, debido a los diversos problemas que se presentan durante esta fase, entre los que destaca la escasa disponibilidad del material vegetal, ya que se requieren arboles juveniles para experimentación.

Por tanto, resulta necesario dirigir nuevas investigaciones que permitan generar bases sólidas para la correcta micropropagación de limón persa, principalmente en la parte del establecimiento del cultivo, utilizando extractos vegetales contra los microorganismos aislados a partir de segmentos nodales de limón persa, con la idea de obtener una concentración óptima que permita inhibir el crecimiento de los contaminantes y promueva el desarrollo del explante. Una vez desarrollado el protocolo de asepsia y propagación, el siguiente paso es la evaluación de los explantes ante SENASICA para comprobar la sanidad de los explantes y poder generar material certificado.

Tabla 2. Micropropagación de los principales patrones de limón persa

Especie	Vía de regeneración	Tipo de explante	Resultados	Autor y año
<i>C. volkameriana</i> , <i>C. swingle</i> y <i>C35</i>	Organogénesis directa	Segmentos nodales	Los segmentos nodales presentaron brotes de hasta un 95%, utilizando 6 mg L ⁻¹ de BAP; teniendo de 2 a 3 brotes por explante.	Martínez-Hernández et al., 2006
<i>C. macrophylla</i> Wester	Embriogénesis somática	Óvulos de frutos inmaduros	En los resultados demuestran que los primeros embriones se formaron a las cinco semanas del cultivo, con un porcentaje del 70% en el medio suplementado con Pectimorf® 10 mg L ⁻¹ , mientras que en los medios que contenían Biobras-6 (10 ⁻³ mg L ⁻¹) y MH-5 (10 ⁻³ mg L ⁻¹) se observaron entre las seis y siete semanas del cultivo, con porcentajes del 56 y 66% respectivamente.	Bao-Fundora et al., 2013
<i>C. aurantifolia</i> Christm. Swing. Var. Mexicana™	Organogénesis indirecta	Segmentos nodales	Los resultados demuestran que la combinación de 1 mg L ⁻¹ de AG ₃ y 2 mg L ⁻¹ de BAP promueve la inducción de brotes de <i>C. aurantifolia</i> con 8.61 brotes por explante en un periodo de 30 días.	Hernández-Jerez et al., 2013
<i>C. aurantium</i> L.	Organogénesis directa	Hipocotilos	La inducción de brotes se observó en el medio de cultivo MS suplementado con 0.8 mg L ⁻¹ de BAP más 0.2 mg L ⁻¹ de AIB con una media de 8 brotes por explante.	Vega-Pérez et al., 1997
<i>C. aurantifolia</i> Christm. Swing. var. "Tahiti"	Organogénesis directa	Meristemos axilares	Los resultados demuestran que el 80% de los explantes expuestos a 0.25 mg L ⁻¹ de BAP presentaron brotes, con un promedio de 2.4 brotes/explante en un periodo de 28 días.	Santiana-Vinueza, 2014
<i>C. aurantifolia</i> Christm. Swing. var. Tahiti	Organogénesis directa	Segmentos nodales	El medio de cultivo suplementado con 0.25 mg L ⁻¹ de BAP presentó 78% de explantes con brotes, con un promedio de 2 brotes/explante en un periodo de 28 días.	Vidal-Rivera, 2014
<i>C. troyer</i> y <i>C. carizzo</i>	Organogénesis directa	Segmentos nodales	El mejor resultado para la inducción de brotes en ambos patrones a los 30 días fue en 2 mg L ⁻¹ de BAP y 2 mg L ⁻¹ de AG ₃ , con un promedio de 2 brotes por explante.	Rojas-Mencio, 2001
<i>C. limon</i>	Organogénesis directa	Yemas apicales	Los resultados demuestran que con la aplicación de 0.1 mg L ⁻¹ de 2, 4-D se obtuvieron 44.4% de brotes posterior a los 7 días de presentarse los cotiledones.	Chavez-Jácome y Arboleda-Fabara, 2011
<i>C. limon</i>	Organogénesis directa	Segmentos nodales	Se observó la proliferación de los brotes de hasta 62.66% en medio de cultivo suplementado con 0.1 mg L ⁻¹ de BAP con un promedio de 1.6 brotes por explante y un 50.26% con 0.5 mg L ⁻¹ de Kinetina con un promedio de 1.2 brotes por explante. Ambos en un periodo de 8 semanas posterior a la inoculación.	Goswami et al., 2013
<i>C. aurantifolia</i> Christm. Swing	Organogénesis directa	Segmentos nodales	La mayor formación de brotes se observó en el medio suplementado con 2 mg L ⁻¹ de BAP, 1 mg L ⁻¹ de Kinetina y 1 mg L ⁻¹ de ANA, con unos 9 brotes por explante durante 8 semanas.	Al-Bahrany, 2002
<i>C. jambhiri</i> Lush.	Organogénesis indirecta	Semillas	Formación de callo a las 5 semanas en un 92% en medio con 1.5 mg L ⁻¹ de 2, 4-D tomando tallos como explante, seguida de una regeneración de brotes de un 70% en medio suplementado con 3 mg L ⁻¹ de BAP.	Shawkat-Ali y Bushra-Mirza, 2006
<i>C. jambhiri</i> Lush.	Organogénesis directa	Semillas	La regeneración de brotes utilizando tallos como explantes fue del 83% en medio de cultivo suplementado con 3 mg L ⁻¹ de BAP, después de 5 semanas.	Shawkat-Ali y Bushra-Mirza, 2006

Bibliografía

- Al-Bahrany A. M. (2002). Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*, (95): 285-295.
- Bao-Fundora L., Hernández-Ortiz R. M., Diosdado-Salcés E., Román-Gutiérrez M. I., González-Arencia C., Rojas-Álvarez A. y Rodríguez-Valdés A. (2013). Embriogénesis somática de *Citrus macrophylla* Wester con el empleo de Pectimorf® y análogos de brasinoesteroides. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 15(1): 189-194.
- Bonga J., Durzan D. (1982). *Tissue culture in forestry*. London, England: Nijhoff/Junk Publisher.
- Bové, J. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*. 88(1): 7-37.
- Cédres M., Sharry S., Adema M y Albedini W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Chaparro-Zambrano H. N., Rodríguez H. A. y Orduz-Rodríguez J. O. (2013). Influencia del virus de la tristeza de los cítricos (CVT) en el comportamiento de lima ácida (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre seis patrones en el piedemonte llanero de Colombia (1997 – 2008). *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 14(1): 33-38.
- Chavez-Jácome J. F. y Arbolera-Fabara M. L. (2011). *Propagación in vitro de limón criollo (Citrus limon) con el empleo de dos reguladores de crecimiento*. Ecuador: Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Curti-Díaz S. A. (1996). El despunte de brotes y el desarrollo del limón persa. *Agrociencia*. 30(3): 405-409.
- Curti-Díaz S. A., Hernández-Guerra C., Loredó-Salazar R. X. (2012). Productividad del limón "persa" injertado en cuatro portainjertos en una huerta comercial de Veracruz, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 18(3): 291-305.
- Davies F. S. y Albrigo L. G. (1994). *Citrus*. Wallingford: CAB International.
- Milla D., Arizaleta M y Díaz L. (2009) Crecimiento de limero "Tahiti" (*Citrus latifolia* Tan.) y desarrollo del fruto sobre cuatro portainjertos en un huerto frutal ubicado en el municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*. 9(1): 85-95.
- González-Segnana L. R. y Tullo-Arguello C. C. (2019). *Guía técnica cultivo de cítricos*. San Lorenzo, Paraguay: FCA, UNA.
- Goswami K., Sharma R., Singh P. K. y Singh G. (2013). Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Physiol Mol Biol Plants*. 19(1):137-145.
- Hernández-Fuentes L. M., Urías-López M. A., Gómez-Jaimes R., López-Arrollo J. I., Velázquez-Monreal J. J. y Orozco-Santos M. (2014). *El huanglongbing y su vector Diaphorina citri en el limón persa en Nayarit: Recomendaciones para su manejo*. Santiago Ixcuintla: INIFAP.

- Hernández-Jerez Y., Silva-Pupo J. J. y Borges-García M. (2013). *In vitro* establishment and multiplication of *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. 'Mexican' from seed. *Biotechnología Vegetal*. 13(3): 181-187.
- Herrera-Flores J. R., Caamal-Velázquez J. H., Ramírez-Benites J. E. y Gutiérrez-Espinosa M. A. (2017). *Establecimiento in vitro de limón persa (Citrus latifolia Tan.) y su propagación masiva*. Campeche: Colegio de Posgraduados.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2017). *Agenda Técnica Agrícola de Veracruz*. Ciudad de México: INIFAP.
- Lee R. F. Lehman P. S. y Navarro L. (2009). Nursery practices and certification programs for budwood and rootstocks. L. W. Timmer and L-W. Duncan. *Citrus health management*. St. Paul, Minn: APS press.
- Loyola-Vargas V. M., De-la-Peña C., Galaz-Avalos R. M. y Quiros-Figueroa, FR. (2008). *Molecular Biomethods Handbook: Second Edition*. USA: Humana Press.
- Martell-Tomanis A. Y., Lobato-Rosales F. G., Luna-Chontal G., García-Santamarina L. E. y Fernandez-Lambert G. (2019). Variables de influencia para la producción de miel utilizando abejas *Apis mellifera* en la región de Misantla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. (10) 14.
- Martínez-Hernández M. de J., López A. A., Osorio-Acosta F., Gallardo-López F., López Moctezuma H. y 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.
- Méndez-Jiménez M. A., Caamal-Velázquez J. H., Criollo-Chan M. A. y Mora-López J. L. (2018). *Evaluación de los extractos naturales de Hibiscus sabdariffa y Allium sativum en el establecimiento aséptico de limón persa (Citrus × latifolia) mediante técnicas de cultivo in vitro*. Chiapas: Universidad Tecnológica de la Selva. (Datos sin publicar).
- Mendoza A., Alvarado O., Cruz M. y Barrera H. (2005). Caracterización molecular de razas severas y débiles del virus de la tristeza de los cítricos. *Ciencia UANL*. (7). 266-273.
- Franck Curk, Frédérique Ollitrault, Andres Garcia-Lor, Francois Luro, Luis Navarro and Patrick Ollitrault. (2016) Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of botany*. (117): 565-583.
- Osorio-Mora O. y Zacarias L. (2000). Efecto de las bajas temperaturas en la biosíntesis de etileno en discos de flavedo de la mandarina "Fortune". *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*. 3(1). 53-64.
- Pérez-Tornero O., Tallo C. I., Porras I. (2010). An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon* from mature nodal segments. *Plan cell, Tissue and Organ Culture*. (112): 101-108.
- Pérez-Luna A. I., Gutiérrez-Espinosa M., Zavaleta-Mancera H. A., Mora-Aguilera G y Robledo-Paz A. (2013). *Efecto de precursores y reguladores de crecimiento en la formación de brotes adventicios a partir de explantes de limón persa (Citrus latifolia)* (Tesis de Mestría). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Pérez-Luna A. I., Gutiérrez-Espinosa M. A., Zavaleta-Mancera H. A., Robledo-Paz A. y Mora-Aguilera G. (2015). Respuesta histológica a inductores de procesos morfogenéticos en *Citrus latifolia* Tan. *Interciencia*. 40(5): 343-349.
- Quiroga-Cardona J., Hernández-Parrado F. L., Silva-Herrera M del R. y Orduz-Rodríguez J. O. (2010). Comportamiento de la producción de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertada sobre el patrón de Mandarina Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) y la influencia del virus de la tristeza (CTV) en condiciones de piedemonte del Meta. 1997-2008. *Orinoquia*. 14(1): 5-15.
- Rocha P. M. A., Lee R. F., Lastra R., Niblett C. L., Ochoa C. F. M., Garnsey S. M. y Yokomi R. K. (1995). Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*. (79): 437-445.
- Rocha P. M. A., Ochoa C. F. M., Martínez S. J. P., Roistacher C. N. y Lee R. F. (1998). Citrus tristeza virus: Events that occur before, during and after the disease epidemics. *Subtropical Plant Science*. (50): 26-36.
- Rodríguez M., Guerrero M., García C., Portillo F., García P, García J. y Mendoza E. (2002). Guía técnica: Cultivo de limón pérsico. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Consultado el 08 de agosto del 2020 de: <http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/Limon.pdf>.
- Rojas-Mencio P. (2001). *Establecimiento de una metodología para la micropropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC)*. Córdoba-Orizaba: Universidad Veracruzana.
- Rouiss H, F. Bakry, Y. Froelicher, P. Aleza and P. Ollitrault. (2018). Origin of *C. latifolia* and *C. aurantifolia* triploid limes: the preferential disomic inheritance of doubled-diploid 'Mexican' lime is consistent with an interploidy hybridization hypothesis. *Annals of Botany*. (121): 571-585.
- Santiana-Vinueza W. R. (2014). *Establecimiento in vitro de lima ácida (Citrus aurantifolia [Christm] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas apicales*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- Shawkat-Ali y Bushra-Mirza (2006). Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Bot*. 65(2): 137-146.
- SIAP (2020). Cierre de la producción agrícola por cultivo, Anuario estadístico de la producción agrícola, producción anual. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Singh I. P. (2002). Micropropagation in citrus – A review. *Agric. Rev*. 23(1): 1-13.
- United States Department of Agriculture. (2020). *Citrus: World Markets and Trade*. Foreign Agricultural Service.
- Vega-Pérez J., Verde-Star M. J., Gamez-Gonzalez H., Oranday-Cardenas A., Cerda-Cardenas E y Hernández-Mercado R. (1997). *Renovación in vitro de naranjo agrio (Citrus aurantium Linn.)*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Vidal-Rivera M. V. (2014). *Propagación in vitro de lima ácida (Citrus aurantifolia [Christm] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de segmentos nodales*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- Zamora-Rodríguez V., Luis-Pantoja M., Peña-Bárcaga I., Ferríol-Marchena X. y Hernández-Rodríguez L. (2015). Uso del microinjerto *in vitro* de ápices caulinares para eliminar "Candidatus Liberibacter asiaticus" en cultivares de cítricos en Cuba. *Rev. Protección Veg*. 30(2): 123-132.