

Capítulo II

Manejo de semillas para la producción de portainjertos de cítricos

Julienne Barreto

Hover Beltrán

Alejandro Jaramillo

Nubia Murcia

Mauricio Fernando Martínez

Las semillas son consideradas como el punto de partida para el establecimiento de un sistema productivo. Disponer de semilla de calidad es la base del éxito de una inversión a largo plazo, ya que esta propiedad de las semillas hace parte de un grupo de características deseables que tienen un fuerte impacto sobre las fases de desarrollo, establecimiento y producción del cultivo (Doria, 2010).

Al iniciar un proceso productivo, es necesario garantizar que los frutos utilizados para la extracción de semillas tengan su origen de árboles productivos y bien formados que se encuentren establecidos específicamente para este propósito, con condiciones óptimas de sanidad, con el fin de minimizar el riesgo de la transmisión de enfermedades limitantes para el desarrollo de las plantas.

La multiplicación de plantas de cítricos se realiza mediante la injertación, proceso que consiste en la unión de dos partes conformadas por el portainjerto, que aporta el sistema radical, y una parte del tallo, sobre el cual se injerta la yema que forma la copa o parte aérea que se desarrolla y produce los frutos de interés comercial. Emplear un portainjerto permite acortar el periodo del árbol para entrar en producción, mejorar los rendimientos y la calidad de los frutos, favorecer el desarrollo de materiales que se adapten a diversos suelos y a las condiciones agroclimáticas, y brindar resistencia a las principales enfermedades sistémicas (Gallego et al., 2017).

Una práctica importante para garantizar la sanidad de las semillas es el descarte de aquella fruta que se encuentre en el suelo, así como de aquellas otras localizadas en el área del dosel. Esta recomendación evita la posible contaminación por *Phytophthora* spp. y otros patógenos que comprometen el almacenamiento de semillas y el desarrollo de portainjertos (Neto et al., 2016).

Descripción de los portainjertos de mayor uso en Colombia

Los portainjertos de cítricos (Rutaceae) se dividen en tres grandes grupos de acuerdo con su origen y clasificación taxonómica: *Citrus*, *Poncirus* e híbridos intergénicos.

Género *Citrus*

En el género *Citrus* se encuentra el limón Volkameriana (*Citrus volkameriana* Ten. y Pasq.), un portainjerto tolerante a enfermedades causadas por virus y viroides como el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), exocortis (CEVd), psorosis (complejo viral) y las causadas por oomicetos como la gomosis de los cítricos (*Phytophthora* sp.).

Se cree que el *C. volkameriana* es un híbrido de limonero (*C. reticulata*) con naranjo agrio de origen italiano (*C. medica*) (Villalba, 2000), muy vigoroso, con resistencia media a salinidad y asfixia radicular. Aunque induce copas productivas, el número es menor en relación con otros patrones (Abdallah et al., 2021) y se caracteriza por tener un porte alto (figura 3a).

Este portainjerto es el más usado en Colombia para la producción de la lima ácida Tahití, debido a su rápida entrada en producción; sin embargo, le proporciona un color verde pálido a la fruta que limita su demanda para el mercado de exportación, en el que se prefiere la corteza con una tonalidad verde intensa (figura 3d-f).



Foto: Mauricio Martínez y Hover Beltrán

Figura 3. Detalle de la morfología de *Citrus volkameriana*. a. Porte del árbol; b. Hojas de *C. volkameriana*; c. Detalle de la flor; d. Fruto *in situ*; d. Detalle del tamaño del fruto; e. Fruto *in situ*; f. Detalle del fruto.

Género *Poncirus*

Dentro del género *Poncirus* se encuentran árboles que presentan hojas trifoliadas e inducen porte medio y bajo a las copas injertadas en ellos. Generalmente, inician producción en épocas tempranas, disminuyendo los tiempos de floración a cosecha. Se ha reportado tolerancia a CTV, psorosis y gomosis, y susceptibilidad a exocortis. De este género, los portainjertos de mayor uso en la citricultura son Flying Dragon (*Poncirus trifoliata* var. *monstrosa*), que induce árboles de porte bajo, y Kryder 15-3 (*Poncirus trifoliata* (L.)), que induce árboles de porte medio.

- **Flying Dragon, *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa*.** Portainjerto trifoliado que induce porte bajo o enanismo en las copas injertadas (figura 4). Se utiliza comúnmente en países con huertos establecidos en altas densidades de siembra. En Colombia, se ha evaluado su comportamiento sobre naranjas Sweety Orange y Salustiana, en mandarinas Arrayana, Clementina y tangelo Minneola, con porte bajo y alta eficiencia productiva (Vásquez Amariles, 2013). La multiplicación en vivero de este portainjerto requiere un periodo aproximado de seis a ocho meses desde el trasplante hasta la injertación.
- **Kryder 15-3.** Selección de la naranja trifoliada (*P. trifoliata* (L.) Raf.). Esta selección de portainjerto induce porte medio en las copas de las variedades injertadas, tolerante al CTV, caquexia, psorosis y *Phytophthora* sp. Algunos estudios indican que mejora la calidad de la fruta en otras especies de cítricos como la lima ácida Tahití (Murcia et al., 2020).



Foto: Mauricio Martínez y Hover Beltrán

Figura 4. Detalle de la morfología de *Poncirus trifoliata*. a. Porte del árbol; b. Hojas de Flying Dragon; c. Fruto *in situ*; e. Detalle del tamaño del fruto; f. Detalle del fruto.

Grupo de híbridos intergenéricos

Los híbridos intergenéricos son patrones de porte medio y normal, con tolerancia a la mayoría de las enfermedades causadas por virus, a excepción de la exocortis producida por el viroide CEVd. En este grupo se encuentran el Citrumelo CPB 4475 (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf), los Citranges Carrizo (*Citrus sinensis* ‘Washington’ sweet orange × *Poncirus trifoliata*), Troyer (*Citrus sinensis* ‘Washington’ sweet orange × *Poncirus trifoliata*), y las citrandarinas, Sunky × English (*Citrus sunki* Hort. ex Tan. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (Universidad de California Riverside [UCR], 2018).

- **Citranges.** Híbridos del cruce de naranja Washington sweet orange (*Citrus sinensis*) × naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) (UCR, 2018). Los más conocidos en la actualidad son Carrizo (× *Citroncirus* sp.) (figura 5) y Troyer (× *Citroncirus* sp.) (figura 6). En general, las variedades injertadas sobre estos son vigorosas, de rápido desarrollo y tamaño uniforme; además, mejoran el tamaño y acidez del fruto. Son de porte medio y susceptibles a presentar deficiencia de zinc debido a la distribución de su sistema radical (característico de los patrones que provienen de la naranja trifoliada).

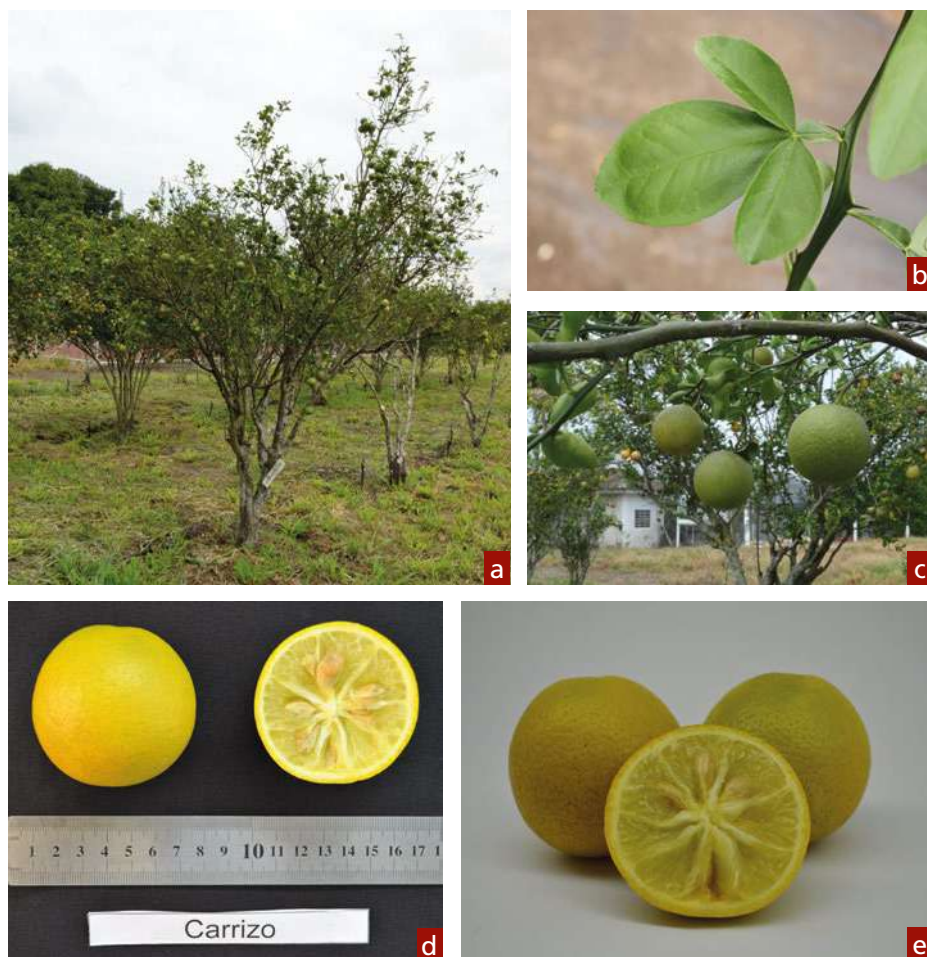


Foto: Mauricio Martínez y Hover Beltrán

Figura 5. Detalle de la morfología de Carrizo × *Citroncirus* sp. a. Porte del árbol; b. Hojas del cultivar Carrizo; c. Fruto *in situ*; d. Detalle del tamaño del fruto; e. Detalle del fruto.

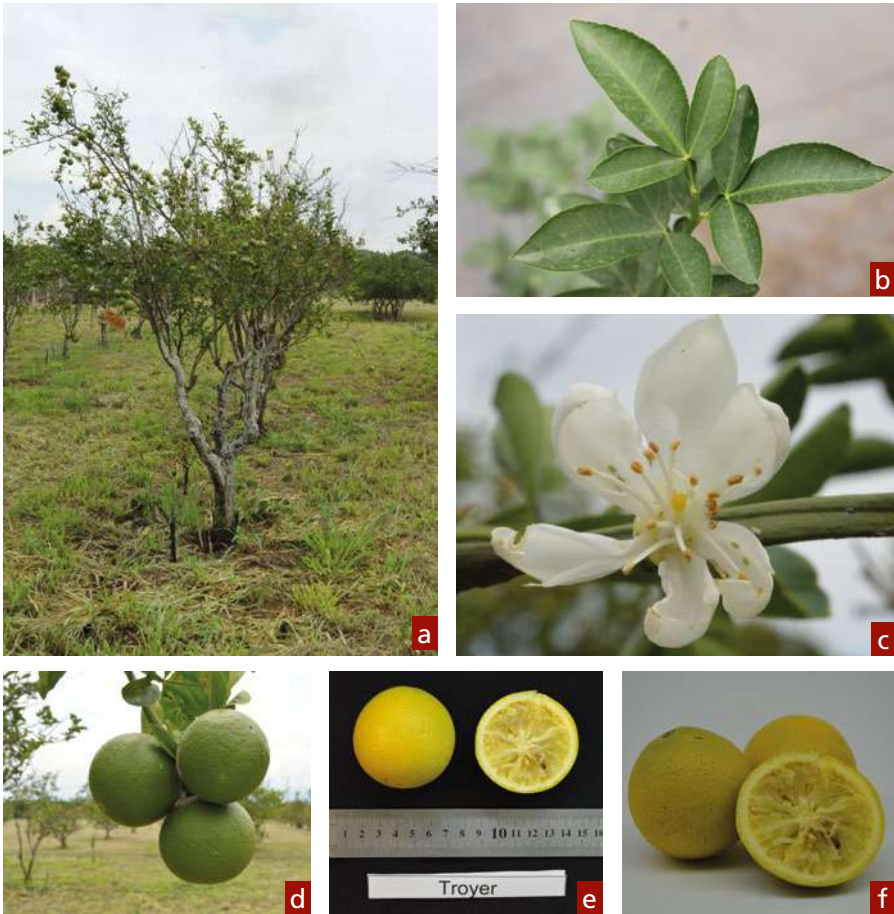


Foto: Mauricio Martínez y Hover Beltrán

Figura 6. Detalle de la morfología de Troyer \times *Citroncirus* sp. a. Porte del árbol; b. Hojas del cultivar Troyer; c. Detalle de la flor; d. Fruto *in situ*; e. Detalle del tamaño del fruto; f. Detalle del fruto.

- **Citrumelos.** Híbridos del cruce de pomelo Hall grapefruit (*Citrus paradisi* Macfadyen) y Rubidoux trifoliolate (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). El más representativo en el país es el \times *Citroncirus* spp. (también conocido como CPB 4475) (figura 7a-c). Es tolerante a CTV, caquexia y *Armillaria*, y resistente a *Phytophthora* sp.; no obstante, es susceptible a exocortis y a suelos salinos. Se adapta bien a suelos con textura arenosa o limosa.



Foto: Mauricio Martínez y Hover Beltrán

Figura 7. Detalle de la morfología de CPB 4475 × *Citroncirus* spp. a. Porte del árbol; b. Hojas; c. Detalle del tamaño del fruto; d. Detalle del fruto.

- **Sunki × English (S × E).** Portainjerto que se utiliza comúnmente en Colombia para la multiplicación de naranjas, mandarinas y limas ácidas; tiene hojas trifoliadas e induce portes medios en estos materiales. Se originó por la hibridación entre la mandarina *C. sunki* Hort. ex Tan. y la naranja trifoliada *P. trifoliata* (L.) Raf. (Gallego et al., 2017). Las variedades lima ácida Tahití (*Citrus × latifolia*), naranja Valencia (*Citrus sinensis*) y tangelo Minneola (*C. reticulata*) presentan una alta eficiencia productiva (López & Cardona, 2007; Murcia et al., 2020). Actualmente, se evalúa su comportamiento en huertos a alta densidad de siembra (figura 8).



Foto: Mauricio Martínez y Hover Beltrán

Figura 8. Detalle de la morfología de Sunki × English. a. Porte del árbol; b. Hojas trifoliadas; c. Detalle de la flor; d. Fruto *in situ*; e. Detalle del tamaño del fruto; f. Detalle del fruto.

De acuerdo con el efecto de diferentes patrones, los portes de los árboles cítricos se clasifican en 1) porte alto: limón Volkameriana; 2) porte medio: Troyer, Carrizo, S × E, CPB 4475; y 3) porte bajo: Flying dragón, Kryder 15-3 (Arango et al., 2009; International Plant Genetic Resources Institute [IPGRI], 1999) (figura 9).

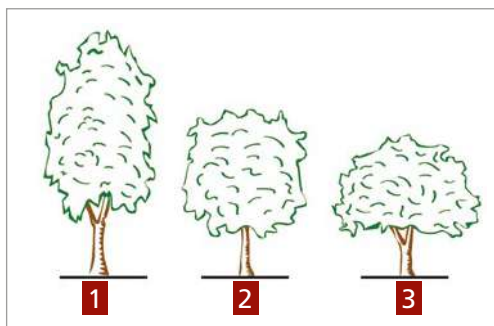


Figura 9. Diferentes hábitos de crecimiento de los patrones de cítricos. 1. Porte alto; 2. Porte medio; 3. Porte bajo.

Fuente: Elaboración propia

Características de las semillas de los portainjertos de cítricos

En general, las semillas de cítricos son ovales, anchas y redondeadas en uno de sus extremos (figura 10). La textura visual de la cubierta de la semilla varía entre arrugada y áspera o lisa y brillante; además, presentan tamaños y pesos variables, dependiendo del tipo de portainjerto (Khan et al., 2002).



Foto: Juliene Barreto

Figura 10. Tipo de semillas de los portainjertos de mayor uso en la multiplicación de plantas. a. Semillas de Citrange Carrizo; b. Semillas de Flying Dragon; c. Semillas de Sunky × English; d. Semillas de Citrange Troyer; e. Semillas de limón Volkameriana.

En la tabla 1 se presenta una caracterización de pesos y número de semillas promedio obtenidos en los frutos de los portainjertos producidos en AGROSAVIA, C. I. Palmira, y de mayor uso en la citricultura del país.

Tabla 1. Características de frutos y semillas de algunos portainjertos producidos en AGROSAVIA, C. I. Palmira

Portainjerto	Peso de frutos (g)	Número promedio de semillas por fruto	Semillas puras (%)	Semillas vanas (%)	Número de semillas / kg
Citrange Carrizo	89,7	16	62,5	37,5	3.500
Citrange Troyer	71,7	16	54,1	45,9	3.500
Flying Dragon	29,0	25	89,6	10,4	5.000
Citrumelo CPB 4475	127,5	15	72,9	27,1	5.500
Sunki × English	36,2	13	99,8	0,2	8.000
Limón Volkameriana	179,4	17	88,2	11,8	8.000

Fuente: Elaboración propia con base en Murcia et al. (2020)

Dentro de los frutos de un mismo patrón, existen diferentes tamaños de semillas; por esta razón, se recomienda seleccionar las semillas de mayor tamaño. Según Carvalho y Nakagawa (2000), las semillas de mayor tamaño obtienen una mejor nutrición durante su crecimiento y, por esta condición, tienen embriones mejor desarrollados y con mayor cantidad de sustancias de reserva.

Otra característica importante de las semillas de algunos cítricos es el desarrollo de más de un embrión dentro de un óvulo (figura 11) (Sánchez et al., 2006). Esta condición se considera uno de los aspectos más relevantes al momento de la selección del portainjerto, ya que, a mayor tasa de poliembrionía, aumenta la probabilidad de obtener plántulas uniformes y genéticamente idénticas a la planta madre, característica importante para la multiplicación comercial de cítricos (Soares et al., 2002).



Fotos: Juliene Barreto y Mauricio Fernando Martínez

Figura 11. Desarrollo de embriones en semillas de portainjertos de cítricos; a. Aspecto de los embriones. b. Semilla de Sunky × English con poliembriónía.

En la tabla 2 se presentan los porcentajes de poliembriónía de alguno de los patrones comercializados en el país; sin embargo, estos porcentajes puede variar con la edad de la planta, el estado nutricional, el desarrollo fisiológico, la ubicación de las ramas cosechadas, entre otros factores (Sánchez et al., 2006).

Tabla 2. Porcentajes de poliembriónía de patrones producidos a nivel comercial en Colombia

Portainjerto	Porcentaje de poliembriónía (%)
Limón Volkameriana	37,8
Mandarina Cleopatra	84,7
Citrumelo CPB 4475	39,5
Citrange Troyer	67,0

Fuente: Elaboración propia con base en Andrade-Rodríguez et al. (2003) y Sánchez et al. (2006)

Proceso de extracción, secado y almacenamiento de las semillas

La extracción de la semilla se debe realizar a partir de frutos que hayan alcanzado un completo desarrollo morfológico y fisiológico, porque estas condiciones garantizan que se obtenga una germinación uniforme del lote de semillas, con mejor desarrollo de las plántulas (figura 12).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 12. Frutos de portainjertos de cítricos en estado de madurez óptimo para la cosecha y obtención de semillas. a. Sunky \times English; b. Citrumelo CPB 4475.

La extracción de semillas se debe hacer bajo condiciones de sombra, con alta disponibilidad de agua y con condiciones adecuadas de limpieza, que eviten cualquier contaminación cruzada que pueda afectar o inhibir la germinación. La extracción se puede realizar de forma manual o mecánica, teniendo en cuenta los recursos disponibles y la cantidad de semillas por extraer (Arango et al., 2010). Al momento de la extracción, no se deben mezclar los frutos de diferentes portainjertos.

Para la extracción manual, se recomienda realizar un corte circular y superficial por la sección ecuatorial de la fruta, teniendo la precaución de no generar daños a las semillas durante el corte. Las partes de la fruta se separan girándolas en sentido opuesto por medio de una torsión manual. La extracción se realiza aplicando presión en ambas partes de la fruta (figura 13).



Figura 13. Proceso de extracción de semillas de patrones. a. Corte superficial en sección ecuatorial; b. Torsión manual; c. Apertura del fruto sin daño en las semillas.

La extracción mecánica se realiza con equipos que cortan y comprimen los frutos separando las semillas de la pulpa, sin producir daños. Es importante que durante todo el proceso se conserve la identificación de cada lote, para evitar una mezcla física de las semillas en caso de trabajar simultáneamente con diferentes portainjertos, lo cual no es recomendable.

Luego de la extracción, se debe remover completamente el mucilago mediante el lavado de las semillas con agua a presión (figura 14). Algunos autores recomiendan el lavado con enzimas pectolíticas o cal (Puerta, 2009).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 14. Extracción y lavado de semillas de cítricos. a. Extracción de semillas manual con presión; b. Lavado de semillas.

Con el fin de garantizar la uniformidad de las semillas y realizar el descarte de las semillas con malformaciones o vanas, se recomienda introducir el lote en una inmersión en agua, donde por diferencia de pesos las semillas completas y bien desarrolladas se depositarán en el fondo de recipiente, mientras que las semillas vanas e incompletas flotarán sobre la superficie; estas semillas se deben descartar (figura 15a). Después de eliminar las impurezas, se drena el agua y se continúa con el secado de las semillas (figura 15b).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 15. Descarte de semillas y tratamiento de semillas. a. Descarte de semillas vanas por flotación; b. Lote de semillas en proceso de secado.

El secado de las semillas se debe realizar bajo la sombra, con el fin de garantizar la calidad fisiológica de las semillas durante la emergencia y almacenamiento. Si se requiere almacenar el lote de semillas, se recomienda un tiempo de secado máximo de 48 horas. Si la siembra de las semillas es inmediata a la extracción, se recomienda secarla durante cuatro horas.

Para disponer de semillas durante todo el año, en estudios realizados por AGROSAVIA entre 2008 y 2017 con los portainjertos Citrange Carrizo, limón Volkameriana, Citrumelo CPB 4475, Mandarina Cleopatra y Sunky × English, se evaluaron diferentes tiempos de secado, tipos de empaque y condiciones de almacenamiento. Los resultados obtenidos sugieren que una temperatura de almacenamiento de 4 °C, bolsas de aluminio como empaque y un secado previo durante 48 horas son condiciones que garantizan porcentajes de emergencia superiores a 70 %; estos valores superan los mínimos definidos en la Resolución 3168 de 2015 del ICA, que especifica que, para patrones como el limón Volkameriana y la mandarina Cleopatra, se deben obtener porcentajes de germinación superiores al 60 %.

En la figura 16 se presenta el comportamiento germinativo de semillas del portainjerto Citrange Carrizo, al ser sometidas a diferentes tiempos de secado, entre 48 y 120 horas. Se observa que, a medida que el tiempo de secado aumenta, el contenido de humedad disminuye, condición que reduce la emergencia en un 32 %.

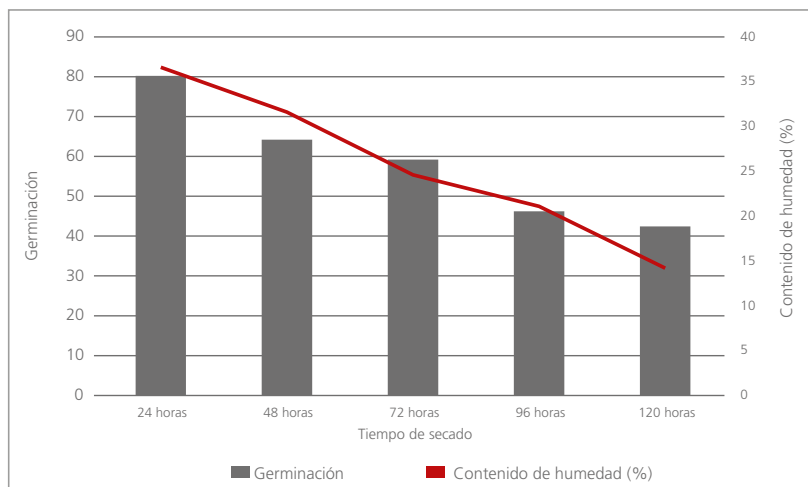


Figura 16. Efecto del tiempo de secado sobre el contenido de humedad y el porcentaje de germinación de semillas de portainjerto Citrange Carrizo, 2016.

Fuente: Resultados obtenidos en el proyecto “Bases tecnológicas para la certificación genética fisiológica y sanitaria de cítricos” (2016).

En la figura 17 se presentan los porcentajes de germinación obtenidos en las condiciones de almacenamiento descritas anteriormente para semillas del portainjerto Sunkya × English, cuyos resultados indicaron que las semillas de este portainjerto se pueden almacenar durante 270 días (9 meses) y la germinación se mantiene por encima del 60 %.

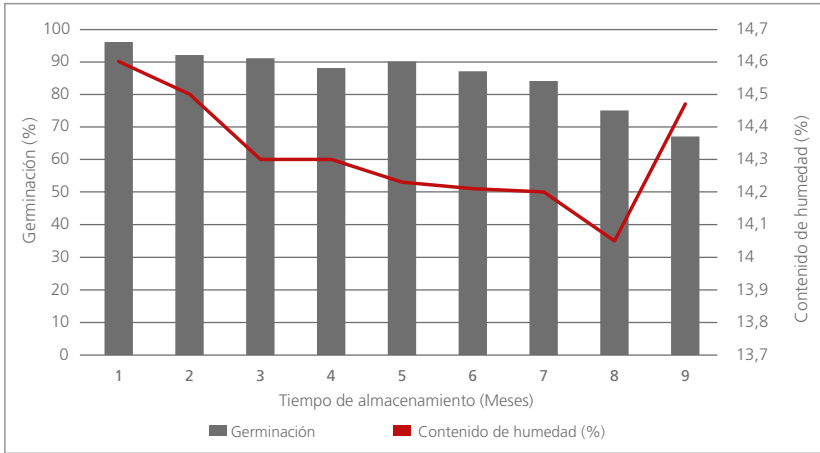


Figura 17. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el porcentaje de germinación y contenido de humedad de semillas de Sunkya × English.

Fuente: Resultados obtenidos en el proyecto “Bases tecnológicas para la certificación genética fisiológica y sanitaria de cítricos” (2016).

Para proteger las semillas de microorganismos patógenos durante el almacenamiento y la emergencia (*complejo damping off*), se recomienda la aplicación de fungicidas protectantes (figura 18). Es importante indicar que los productos químicos utilizados en esta práctica deben estar registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).



Foto: Juliene Barreto

Figura 18. Semillas del portainjerto Sunkya × English tratadas con fungicidas protectantes.

Durante el almacenamiento, es necesario que cada empaque este rotulado, con el tipo de portainjerto, la fecha de almacenamiento y demás información exigida en la Resolución 3168 de 2015 según la categoría registrada. Para el establecimiento de semilleros, se recomienda realizar pruebas de viabilidad de germinación y emergencia, con el fin de evaluar la calidad del lote de semilla almacenado. Esta práctica también se debe realizar para la comercialización de semillas de los portainjertos.

Evaluación de viabilidad de semillas de portainjertos de cítricos

La viabilidad de una semilla hace referencia a su capacidad de germinar y originar una plántula normal en condiciones ambientales favorables. Dicha viabilidad puede ser cuantificada a través de diferentes tipos de pruebas, como la evaluación de la germinación y la emergencia, y algunas técnicas bioquímicas, como la prueba de tetrazolio (García & Villamil, 2001; Rodríguez et al., 2008).

Se debe disponer de una cantidad específica de semillas que se puedan identificar físicamente, denominado lote de semillas, para evaluar su viabilidad. A partir de este lote, se obtiene una muestra de un tamaño adecuado para cada una de las pruebas, con la que se pueda inferir el comportamiento y características del lote (ISTA, 2018). El tamaño de la muestra depende del tipo de prueba que se realice.

Como resultado de los proyectos “Nuevas tecnologías para la producción masiva de plántulas sanas de lima acida Tahití en casa de malla antipulgón para la competitividad del sector viverista y productivo de Colombia 2007-2010” y “Tecnología de manejo de viveros y bases tecnológicas para la certificación genética fisiológica y sanitaria, Fase I 2015-2017”, se definió un tamaño de muestra de hasta 150 semillas, distribuidas en cinco repeticiones cuando se realizan pruebas de laboratorio, y un número máximo de 120 semillas, distribuidas en tres repeticiones cuando se realizan pruebas de emergencia en casa de malla (Jaramillo et al., 2012).

Una vez se tiene la muestra representativa del lote de semillas, se realiza una caracterización inicial que permite determinar el índice de semillas (g/100 semillas) y se calcula el porcentaje de humedad inicial en base húmeda mediante el método gravimétrico, teniendo en cuenta los pesos iniciales y finales de las semillas: el peso inicial, antes de someterlo al horno, y el final, después de una hora de secado a 130 °C (Hong & Ellis, 1996).

Métodos de evaluación de viabilidad de semillas

Los ensayos de germinación y emergencia permiten determinar el potencial de germinación máximo de un lote de semillas y estimar su valor potencial para la siembra en campo; de esta manera, se conoce la proporción de plantas efectivas de acuerdo con el número de semillas sembradas en la muestra (ISTA, 2018; Rodríguez et al., 2008). Estas pruebas ofrecen una primera información respecto a la calidad de las semillas e informan sobre aquellas que han reanudado su actividad metabólica rápidamente; sin embargo, hay que señalar que en algunos casos los resultados que se obtienen en condiciones controladas difieren de los obtenidos en campo (Peretti, 1994; Rodríguez et al., 2008). A continuación, se presentan las principales metodologías de evaluación de germinación de las semillas.

Método de evaluación de germinación en cajas de Petri

La prueba de germinación en laboratorio se realiza con una muestra de 150 semillas de cada lote, que debe ser tratada previamente con un fungicida protectante (por ejemplo, carboxin + thiram), en dosis de 1 g de producto comercial por cada 100 g de semilla. En cada una de las cajas de Petri con papel filtro de 90 mm se disponen 15 semillas, que se deben ubicar en un lugar fresco (temperatura de día: $24 \pm 2^\circ\text{C}$; temperatura de noche: 18°C ; humedad relativa: 80 %) y permanecer en condiciones de humedad hasta 30 días (figura 19).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 19. Método para prueba de germinación en cajas de Petri. a. Distribución de semillas por repetición; b. Distribución del ensayo usando 20 semillas por caja Petri.

Método de evaluación de germinación en papel toalla

La prueba de germinación en laboratorio se realiza con una muestra de 150 semillas de cada lote de evaluación, que debe ser tratada previamente con un fungicida protectante (por ejemplo, carboxin + thiram), en dosis de 1 g de producto comercial por cada 100 g de semilla. En un papel de toalla húmedo, previamente esterilizado, se disponen 30 semillas distribuidas en cinco hileras de seis columnas, dejando un borde de 3-4 cm. Posteriormente, se cubre con otro papel toalla humedecido, se enrolla y se amarran los extremos con bandas de caucho para evitar que se deshaga. Los rollos se disponen en cajas plásticas sobre una rejilla. La humedad se revisa diariamente, durante 30 días (figura 20).

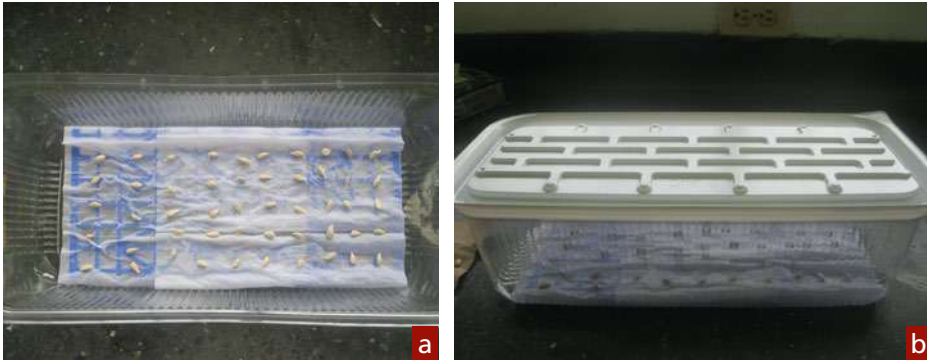


Fotos: Alejandro Jaramillo

Figura 20. Método para prueba de germinación en papel toalla. a. Distribución de semillas por repetición; b. Construcción de rollos por repetición; c. Distribución de los rollos en cajas plásticas.

Método de evaluación de germinación en cámaras húmedas

La prueba de germinación en laboratorio se realiza con una muestra de 150 semillas de cada lote de evaluación, la cual debe ser tratada previamente con un fungicida protectante (por ejemplo, carboxin + thiram), en dosis de 1 g de producto comercial por cada 100 g de semilla. Las semillas se colocan en cajas plásticas sobre papel toalla, ubicado sobre una rejilla plástica que evita el contacto directo del agua con las semillas. Posteriormente, estas cajas se tapan y forman una cámara húmeda. La humedad se revisa diariamente, durante 30 días (figura 21).



Fotos: Alejandro Jaramillo

Figura 21. Método para prueba de germinación en cámaras húmedas. a. Distribución de semillas en papel húmedo; b. Distribución de semillas en la caja plástica.

Método de evaluación de germinación en bandejas

La prueba de germinación en bandejas se realiza en casas de malla y se evalúa la cantidad de semillas que emergen de un sustrato adecuado en condiciones de campo. Esta prueba se realiza en bandejas de germinación de 40 alveolos, usando un sustrato compuesto de turba, vermiculita y cascarilla de arroz en proporciones iguales (1:1:1). También se puede realizar en camas con arena. Las semillas son sembradas a una profundidad de 2 cm y, posteriormente, se les aplica propamocarb + fosetil al 0,3 % para prevenir la contaminación por hongos (figura 22).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 22. Método para prueba de germinación. a. En bandeja de 40 alveolos; b. Germinación en arena.

Para estas pruebas se debe utilizar mínimo tres repeticiones de 40 semillas cada una, para un total de 120 semillas por lote. Las semillas deben ser tratadas previamente con un fungicida protectante (por ejemplo, carboxin + thiram), en dosis de 1 g de producto por cada 100 g de semilla.

Registro de información obtenida en pruebas de germinación en laboratorio

Si una semilla es viable, germinará cuando se someta a las condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura. Por ello, se acepta que la capacidad germinativa de un lote de semillas es un reflejo directo de su viabilidad (García & Villamil, 2001).

Se considera que la semilla ha germinado cuando la radícula ha emergido de las cubiertas seminales, ha alcanzado una longitud mayor a 3 mm y el aspecto de sus estructuras esenciales indica la posibilidad de que termine siendo una plántula normal (ISTA, 2004) (figura 23).



Fotos: Alejandro Jaramillo y Juliene Barreto

Figura 23. Características de las semillas germinadas de portainjertos de cítricos. a. Semilla germinada con radícula emergida; b. Semilla germinada sana con presencia de hojas cotiledonales.

Para los ensayos en laboratorio, los registros del número de semillas germinadas en cada prueba se deben consignar diariamente en un formato (tabla 3) y hasta máximo 30 días después de establecido. Las plántulas que presentan defecto en la raíz, cotiledones o en otras estructuras esenciales se consideran descartadas.

Tabla 3. Formato de registro de semillas germinadas en ensayos en laboratorio

Ensayo de germinación en laboratorio												
Lote			Fecha de establecimiento									
Procedencia												
% humedad inicial												
DDE	Germinadas			Descartes						% germinación		
	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:

Nota. Lote: Número del lote de semillas; Procedencia: Sitio donde proviene la semilla; % humedad inicial: Contenido de humedad de la semilla al momento de la prueba; DDE (días después de establecido): Número de días después del establecimiento de la prueba; Repetición: Número de la repetición; Germinadas: Número de semillas germinadas; Descartes: Número de semillas descartadas; % germinación: Cálculo de porcentaje de germinación en un tiempo determinado.
Fuente: Elaboración propia

Los resultados son expresados en porcentaje de germinación acumulada en el tiempo que dure la evaluación, valor con el cual se construyen las curvas de germinación diarias y acumuladas. El porcentaje es calculado usando la ecuación 1:

$$\% \text{ emergencia} = \frac{\# \text{ semillas germinadas}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

En los ensayos de germinación en casa de malla, se considera que una semilla ha emergido cuando se observa sobre el sustrato una planta con el primer par de hojas verdaderas abiertas (figura 24). Se consideran descartes las plántulas que emergieron, pero presentan algún daño por patógenos o algún tipo de deformación en la base del tallo. El porcentaje de emergencia se calcula usando la ecuación 2.

$$\% \text{ germinación} = \frac{\# \text{ plantas emergidas}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$



Foto: Juliene Barreto

Figura 24. Planta emergida en alveolo

Los registros del número de plantas que emergen del sustrato en los ensayos establecidos en casa de malla se realizan desde los siete días y hasta los treinta días después de siembra, donde se acumula más del 60 % de la germinación. Sin embargo, el periodo de observación para determinar descartes y homogeneizar las plantas se extiende hasta 60 días (tabla 4).

Tabla 4. Formato para registro de germinación en casa de malla

Ensayo de germinación en casa de malla												
Lote	Fecha de establecimiento											
Procedencia												
% humedad inicial												
	Germinadas			Descartes			% germinación					
DDE	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	Rep:	

Nota. Lote: Número del lote de semillas; Procedencia: Sitio donde proviene la semilla; % humedad inicial: Contenido de humedad de la semilla al momento de la prueba; DDE (días después de establecido): Número de días después del establecimiento de la prueba
 Rep.: Número de la repetición; Emergidas: Número de semillas emergidas; Descartes: Número de semillas descartadas; % emergencia: Cálculo de porcentaje de emergencia en un tiempo determinado.

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados de estos ensayos, se construyen gráficas de emergencia diaria y emergencia acumulada, y se calculan valores de vigor y energía germinativa. Las gráficas de emergencia muestran el comportamiento de la germinación de los lotes de semillas y dan un estimado de su viabilidad. Las curvas de emergencia acumulada permiten comparar las tendencias de distintos lotes de semillas, determinando hasta qué momento las semillas pueden llegar a emerger, mientras que las curvas de emergencia diarias determinan qué tiempo de la evaluación es el de mayor capacidad germinativa.

En condiciones de casas de mallas en AGROSAVIA, C. I. Palmira, se evaluó la emergencia de tres lotes de semillas de los portainjertos limón Volkameriana, Citrange Troyer y el híbrido Sunky × English durante 60 días. En las curvas de emergencia acumuladas (figura 25), se observa el comportamiento de la germinación de los distintos portainjertos. Para este ensayo, el limón Volkameriana mostró una mayor velocidad de germinación comparado con los otros dos portainjertos, iniciando la emergencia a los diez días y estabilizándose a los treinta días después de la siembra. Los portainjertos Citrange Troyer y el híbrido Sunky × English iniciaron la germinación cerca de los 20 días, alcanzando el máximo cerca de los 45 días después de sembrados.

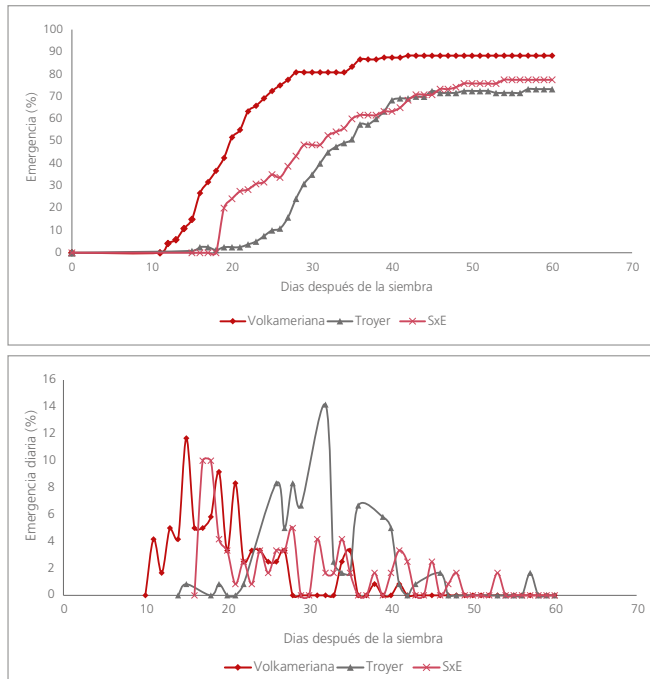


Figura 25. Comportamiento de la germinación de tres portainjertos de cítricos evaluados en casas de malla en AGROSAVIA, C. I. Palmira a. Curva de emergencia acumulada. b. Curva de emergencia diaria. Fuente: Elaboración propia

Evaluación de vigor de semillas y energía germinativa

El vigor germinativo evalúa la rapidez y la uniformidad con que germinaron las semillas en un lote determinado, a través de la ecuación 3, propuesta por Czabator (1962).

$$VG = GDM \times VM \quad \text{Ecuación 3}$$

En la ecuación 3, *GDM* corresponde a los días medios de germinación y *VM* es el valor máximo de germinación, que se calculan mediante las ecuaciones 4 y 5, respectivamente.

$$GDM = \% \text{ final de germinación} \times \text{total días evaluado} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$VM = \frac{\text{Valor máximo germinación acumulativo}}{\text{Total días evaluados}} \quad \text{Ecuación 5}$$

La energía germinativa se define como el máximo porcentaje de semillas germinadas por día durante el periodo de evaluación.

En ensayos realizados en condiciones de casa de malla en AGROSAVIA, se evaluó el vigor y la energía germinativa de cinco lotes de semillas del portainjerto Citrange Carrizo, cada uno con un tiempo de secado distinto. De acuerdo con la tabla 5, las semillas del lote 2 (24 horas de secado) mostraron mayor vigor germinativo (3,7) y mayor emergencia media diaria (1,5) comparado con los demás tratamientos.

Tabla 5. Vigor germinativo, energía germinativa y germinación media diaria de las semillas de cinco lotes de Citrange Carrizo

Lote	Vigor germinativo	Energía germinativa	Germinación media diaria
1	1,8	17,5 (día 27)	1,1
2	3,7	11,7 (día 22)	1,5
3	1,7	10,8 (día 28)	1,1
4	2,3	8,3 (día 28)	1,2
5	0,1	1,7 (día 28)	0,3

Fuente: Elaboración propia

Prueba de tetrazolio para evaluación de viabilidad de semillas

La prueba de viabilidad con tetrazolio está basada en la actividad de ciertas enzimas que participan en las reacciones de respiración que se producen en la mitocondria. Estas enzimas presentes en los tejidos vivos de las semillas reducen la presencia del tetrazolio (2,3,5-trifenilcloruro de tetrazolio) en un color rojo llamado formazán, que tiñe las células vivas (semillas viables), en tanto que las células muertas permanecen sin teñir (semillas no viables) (figura 26).

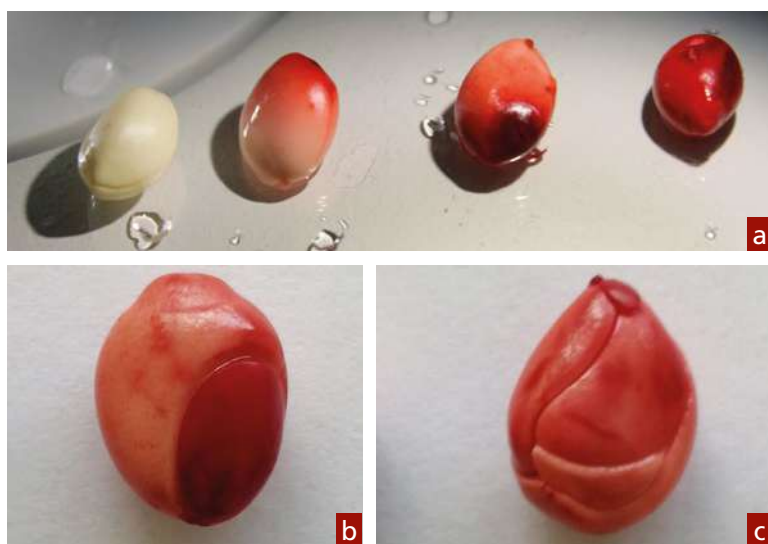


Foto: Mauricio Martínez

Figura 26. Prueba de viabilidad en semillas de portainjertos de cítricos a. Semilla no viable (color blanco) y semillas viables (color rojo en la radícula); b. Semilla monoembrionica viable con una coloración más intensa en el embrión; c. Semilla poliembriónica viable para todos los embriones.

Por lo tanto, la tinción de ciertas partes de la semilla muestra la actividad respiratoria de los diferentes tejidos, lo que permite una evaluación rápida del vigor de semillas viables. La viabilidad de la semilla indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal (Gallo et al., 2015; Glenner, 1990; Moore, 1985; Ruiz, 2009).

La prueba de tetrazolio permite una rápida determinación de la viabilidad de un lote de semillas y de una adecuada evaluación de la capacidad germinativa potencial. Además, sirve de guía para el control de calidad de las semillas en almacenamiento y puede ser útil para estudiar la biología de las semillas y sus procesos de deterioro (Ruiz, 2009).

Multiplicación de semillas de portainjertos de cítricos en ambientes protegidos de casas de malla antipulgón

La multiplicación de semillas comprende la siembra, la emergencia y el trasplante de plántulas a bolsas de vivero. Se debe realizar el establecimiento de semilleros en condiciones protegidas con malla antipulgón para evitar posibles contaminaciones con patógenos transmitidos por insectos vectores. Durante todo el proceso, se debe monitorear la aparición de síntomas asociados a microorganismos patógenos que puedan afectar el proceso de emergencia. Para la siembra se reconocen dos modelos de germinadores, que se expondrán a continuación.

Germinador en arena

Los germinadores en arena se pueden construir utilizando diferentes materiales, como bloques, ladrillos o guadua, según la disponibilidad de la zona (figura 27). El sustrato más utilizado es arena gruesa y sus dimensiones están sujetas a las necesidades particulares de producción de cada vivero. Para facilidad de manejo, se recomienda utilizar camas de 100 a 110 centímetros de ancho, con una profundidad de 30 centímetros. La siembra se realiza en surcos paralelos con una distancia de 10 cm entre surcos y de 3 cm entre semillas. La profundidad de siembra depende del tamaño de la semilla del portainjerto que se sembrará y no debe superar una distancia equivalente a dos veces el tamaño de la semilla.



Foto: Mauricio Martínez

Figura 27. Semilleros en camas de arena gruesa.

Semilleros en bandejas

Se recomienda el uso de bandejas de germinación de 40 alveolos, con un volumen por celda de 130 cm³. En el caso de usar bandejas que fueron utilizadas para siembras anteriores, se recomienda la limpieza de los alveolos con hipoclorito de sodio al 1 % (figura 28).

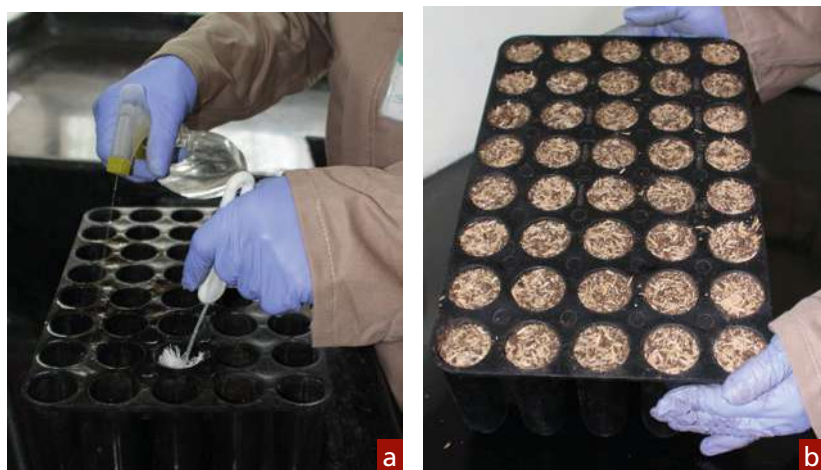


Figura 28. Bandejas recomendadas para la siembra de portainjertos. a. Lavado y desinfección de bandejas; b. Bandejas listas para siembra.

El sustrato elegido para el establecimiento de los germinadores influye en el crecimiento y en la calidad de la plántula que se espera obtener (Ortega-Martínez et al., 2010). Es importante que el sustrato utilizado proporcione buena capacidad de retención y drenaje adecuado, lo que permitirá que las plántulas en desarrollo suplan los requerimientos hídricos, sin afectar la oxigenación del sistema de raíces. Esto proporciona las condiciones físicas adecuadas para el crecimiento y desarrollo del sistema radical (Neto et al., 2016).

Preparación de sustratos y siembra de semillas

Para el llenado de las bandejas, el mercado ofrece diversos materiales de origen natural o sintético, cada uno con características físicas, químicas y biológicas que pueden ser aprovechadas de forma pura o a través de una mezcla. Factores como el precio, la disponibilidad, la facilidad de manejo, entre otros, son aspectos que considerar a la hora de elegir las materias primas que van a conformar el sustrato, que tiene como función brindar soporte y facilitar el anclaje de las plántulas a través del desarrollo del sistema radical (Burgos et al., 2011; Muñoz, 2007).

Bajo condiciones de casa de malla del C. I. Palmira, Burgos et al. (2011) sugieren como fuentes para la preparación del sustrato de germinación insumos como cascarilla de arroz, vermiculita y turba (figura 29).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 29. Insumos utilizados para la preparación de sustrato de germinación. a. Cascasilla de arroz; b. Vermiculita; c. Turba.

La viabilidad de la vermiculita radica en que presenta una buena porosidad y una adecuada retención de humedad (Burgos et al., 2011; Neto et al., 2016), lo que permite una mejor oxigenación del sistema de raíces y proporciona condiciones físicas propicias para el crecimiento normal y desarrollo de las plántulas. La turba también es reconocida como un excelente medio para la germinación por sus características fisicoquímicas, que permiten la obtención de altos porcentajes de emergencia y buen desarrollo radicular; sin embargo, su elevado costo y sus métodos de extracción no sostenibles son factores que restringen el uso de este insumo en la preparación de sustratos (Fernández-Bravo et al., 2006). Una alternativa importante para reemplazar el uso de la turba es la fibra de coco; según Muñoz (2007), esta materia prima presenta una gran capacidad de aireación, buena retención de agua, baja densidad aparente, pH neutro y una estructura física estable, lo que permite altas tasas de emergencia, buen desarrollo del sistema radicular y desarrollo adecuado de las plántulas.

La preparación y el manejo del sustrato se debe realizar en un lugar limpio y sin contacto con el suelo para evitar la contaminación. La mezcla de los insumos se debe hacer en proporciones iguales para aprovechar las características fisicoquímicas de cada materia prima utilizada. Posterior a la mezcla del sustrato, se recomienda una desinfección por métodos físicos, como el vapor de agua, o químicos, con el uso de insumos recomendados para esta labor.

La siembra se realiza teniendo en cuenta la polaridad de la semilla: se debe introducir primero la parte más angosta, lo que evitará la malformación de las raíces. La profundidad de penetración es variable y depende del portainjerto y el tamaño de la semilla, para portainjertos con semillas grandes, como los Citranges, Carrizo y Troyer, la profundidad indicada es de 2,5-3 cm; por otra parte, para semillas pequeñas como limón Volkameriana y Sunky × English, la profundidad de siembra no debe sobrepasar los 2 cm dentro del sustrato. Sobrinho (1991) concluyó que el establecimiento de los semilleros en bandejas produce plantas con sistemas de raíces de mayor volumen, lo que permite una mayor tasa de supervivencia luego del trasplante.

El número de semillas por alveolo se establece en función de la calidad fisiológica y puede variar de una a cuatro semillas. Aquellos portainjertos que presenten mayor tasa de poliembrionía requieren menos semillas, dada la mayor probabilidad de obtener varios embriones por semilla (Neto et al., 2016). AGROSAVIA recomienda la siembra de una a dos semillas por alvéolo (figura 30).



Fotos: Juliene Barreto

Figura 30. Siembra de semillas de portainjertos. a. Introducción de semillas por alveolo; b. y c. Penetración de semillas en el sustrato.

Germinación de las semillas

La germinación de las semillas de los portainjertos inicia a partir de los 15 días después de siembra; sin embargo, a partir de los 20 días se observan los picos más altos de germinación; la emergencia se mantiene hasta los 50 días y finaliza por completo a los 60 días. Estos resultados pueden variar de acuerdo con el portainjerto utilizado y las condiciones ambientales de los sitios donde se establezcan los semilleros, ya que la germinación de las semillas de cítricos varía con la temperatura y la humedad relativa (Schäfer et al., 2006).

En estudios realizados por Moncaleano (2014) en AGROSAVIA, C. I. Palmira, se determinó que una variación en la temperatura de 3 °C afecta la germinación de las semillas de mandarina Cleopatra. En la figura 31, se observa la variación en el porcentaje de germinación de las semillas de mandarina Cleopatra establecidas en dos ambientes: la germinación en el ambiente 1 (23,7 °C y HR: 75,6%) presentó valores superiores al 70%, mientras que la germinación en el ambiente 2 (26,9 °C y HR: 67,2%) solo llegó al 11,7%.

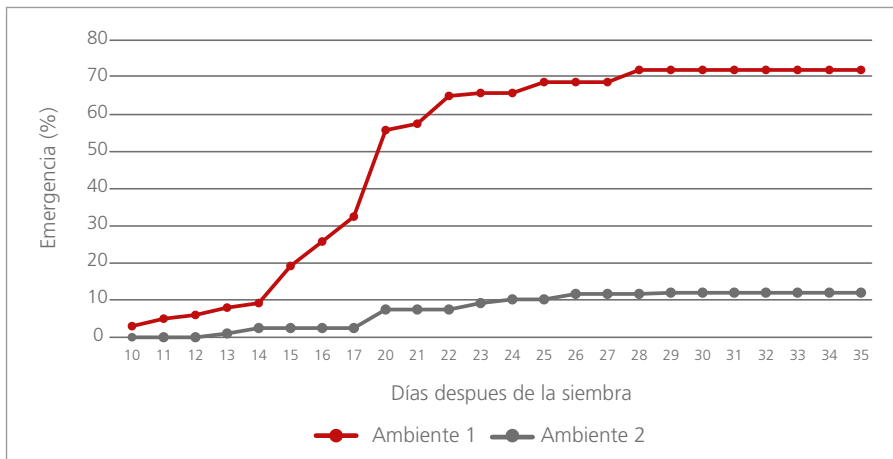


Figura 31. Emergencia de semillas de portainjerto Cleopatra en dos ambientes de germinación
Fuente: Elaboración propia

Durante la fase de germinación, se deben realizar riegos frecuentes para mantener la humedad de los sustratos. También se recomienda la fertilización con fuentes de nitrógeno para estimular el desarrollo vegetativo. Luego de 90 días después de la siembra, las plántulas presentan un desarrollo adecuado para el trasplante a la bolsa con el sustrato.

Al momento del trasplante, es importante descartar aquellas plántulas que hayan desarrollado problemas en su sistema radicular y se deben seleccionar aquellas que tengan una estructura recta y con abundantes raicillas (figura 32).



Foto: Juliene Barreto

Figura 32. Desarrollo óptimo del sistema radicular en patrones listos para trasplante a bolsa

Se deben eliminar las plantas que tengan raíces deformes, denominadas comúnmente como “cola de marrano”, o que estén bifurcadas, o plantas que presenten etiolación (figura 33).



Foto: Juliene Barreto

Figura 33. Aspecto de las plantas consideradas para descarte por problemas en la base del tallo y con raíces deformes

Referencias

- Abdallah, H. B., Elkashif, M. E., Eljack, A. A., & Dafaallah, A. B. (2021). Growth performance of two lemon [*Citrus limon* (L.) Osbeck] cultivars budded on three rootstocks, Gezira State, Sudan. *Gezira Journal of Agricultural Science*, 17(2), 230-242. <http://journals.uofg.edu.sd/index.php/gjas/article/view/1698>
- Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, A., & García-Velázquez, A. (2003). Características morfológicas del fruto y poliembrionía de tres portainjertos de cítricos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(2), 255-261. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2001.10.067>
- Arango, E., Capote, M., Morera, S., & Clemente, J. (2010). Viveros protegidos de cítricos: manejo técnico. En *Taller regional sobre viveros de cítricos*. Instituto de Investigaciones en fruticultura Tropical.
- Arango Wiesner, L. V., Orduz Rodríguez, J. O., & León Martínez, G. A. (2009). Patrones para cítricos en los Llanos Orientales de Colombia (N.º Doc. 22693). <http://hdl.handle.net/20.500.12324/2209>
- Burgos, J. E., Martínez, M. F., Cardozo, C., Jaramillo, A., & Gómez, C. O. (2011). Evaluación de sustratos para la producción de plántulas de limón Volkameriana (*Citrus volkameriana* Ten. y Pasq.) en dos ambientes de casas de malla antipulgón. *Revista Regional Novedades Técnicas*, 12(17), 9-17.
- Carvalho, N. M., & Nakagawa, J. (2000). *Sementes, ciencia, tecnologia e produção*. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n1/ctr11110.pdf>
- Fernández-Bravo, C., Urdaneta, N., Silva, W., Poliszuk, H., & Marín, M. (2006). Germinación de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv 'Río Grande sembradas en bandejas plásticas, utilizando distintos sustratos. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 23(2), 188-196.
- Gallego, C. J. S., Enríquez-Valencia, A. L., Caicedo-Arana, Á., Posso-Terranova, A., & Muñoz-Florez, J. E. (2017). Diversidad genética en patrones de cítricos mediante microsátélites amplificados al azar (rams). *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 85-94. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)85-94](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)85-94)
- Gallo, C., França-Neto, J. B., Arango, M., Gonzalez, S., Francomano, V., Carracedo, C., Costa, O., Alves, R., Margnano, L., & Craviotto, R. (2015). *Validación de la prueba de tetrazolio como método de vigor para semillas de Glycine max*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

- García, F. P., & Villamil, J. M. P. (2001). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General de Estructuras.
- Glenner, G. G. (1990). Formazans and Tetrazolium Salts. En R. D. Lillie & H. J. Conn (Ed.), *Biological Stains* (pp. 225-235). Sigma Chemical Company.
- Hong, T. D., Linington, S., & Ellis, R. H. (1996). Seed storage behavior: a compendium. IPGRI. https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Seed_storage_behavior__a_compendium_1576.pdf
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (7 de septiembre de 2015). *Resolución 3168, “Por medio de la cual se reglamenta y controla la producción, importación y exportación de semillas producto del mejoramiento genético para la comercialización y siembra en el país, así como el registro de las unidades de evaluación agronómica y/o unidades de investigación de fitomejoramiento y se dictan otras disposiciones”*. <https://www.ica.gov.co/getattachment/4e8c3698-8fcb-4e42-80e7-a6c7acde9bf8/2015R3168.aspx>
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). (1999). *Descriptors for Citrus (Citrus spp.)*. International Plant Genetic Resources Institute. <https://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/descriptors-for-citrus-citrus-spp/>
- International Seed Testing Association (ISTA). (2004). *International Rules for Seed Testing*. ISTA.
- Jaramillo, A., Martínez, M., Cardozo, C., & Burgos, J. (2012). Determinación de condiciones controladas de almacenamiento seguro para semillas de portainjertos de lima ácida ‘Tahiti’. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol13_num2_art:250
- Khan, M., Usman, M., Khan, M. M., Waseem, R., & Ali, M. A. (2002). Role of gibberellic acid (GA3) on citrus seed germination and study of some morphological characteristics. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 39(2), 113-118.
- López, J. A., & Cardona, J. H. (2007). *Evaluación de portainjertos de cítricos en la zona central cafetera de Colombia* (Doc. N.º 23749). Centro Nacional de Investigaciones de Café. <https://repositorio.fedepalma.org/handle/123456789/76341>
- Moncaleano, K. (2014). *Estudio de factores de calidad fisiológica de las semillas de siete portainjertos de cítricos* [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.
- Moore, R. P. (1985). *Handbook on Tetrazolium Testing*. International Seed Testing Association.

- Muñoz, Z. P. (2007). *Comparación del sustrato de fibra de coco con los sustratos de corteza de pino compostada, perlita y vermiculita en la producción de plantas de Eucalyptus globulus (Labill)* [Tesis de pregrado]. Universidad Austral de Chile.
- Murcia-Riaño, N., Martínez, M. F., Orduz-Rodríguez, J. O., Ríos-Rojas, L., López-Galé, Y., Yacomelo-Hernández, M. J., Carabalí-Muñoz, A., Kondo, T., García-Muñoz, M. C., Mesa, N. C., López-González, J., Pérez-Artiles, L., Rodríguez-Mora, D. M., Montes-Rodríguez, J. M., Betancourt-Vásquez, M., Rodríguez-Torres, I. V., Barreto-Rojas, J. A., Tarazona-Velásquez, R., Mateus-Cagua, D. M., ... Rodríguez-Roa, A. (2020). *Modelo productivo de lima ácida Tahití (Citrus × latifolia Tanaka ex Q. Jiménez) para Colombia*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).
- Neto, H. B., Rodrigues da Silva, S., Mourão Filho, F. de A. A., Sposito, M. B., & Caputo, M. M. (2016). *The Citrus Nursery Practices in Brazil*. Vivecitrus Organização Paulista de Viveiros de Mudas Cítrica.
- Ortega-Martínez, L.D., Sánchez-Olarte, J., Díaz-Ruiz, R., & Ocampo-Mendoza, J. (2010). Effect of different substrates on tomato seedlings growth (*Lycopersicon esculentum* MILL). *Ra Ximhai*, 6(3), 365-372.
- Peretti, A. (1994). *Manual para análisis de semillas*. Hemisferios Sur Editorial.
- Puerta, G. I. (2009). Efecto de enzimas pectolíticas en la remoción del mucilago de *Coffea arabica* L., según el desarrollo del fruto. *Cenicafé*, 60(4), 291-312. <http://hdl.handle.net/10778/57>
- Ruiz, M. A. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. *EEA INTA Anguil Argentina*, 77, 1-19. https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-el_analisis_de_tetrazolio_en_el_control_de_calidad_de_.pdf
- Rodríguez, Q. I., Adam, G., & Durán, J. M. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 78(912), 836-842. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2767398&orden=1&info=link>
- Sánchez, J. J., Avitia, E., Castillo, A. M., Villegas, Á., & Corona-Torres, T. (2006). Estudio anatómico de la poliembrionía en tres portainjertos de cítricos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 145-152. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912203>
- Schäfer, G., Dutra, P. V., Koller, O. C., & Schwarz, S. F. (2006). Desarrollo vegetativo de patrones cítricos cultivados en condiciones de invernadero bajo dos sistemas de riego. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2), 227-230. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000200016>

- Soares Filho, W. D. S., Diamantino, M. S. A. S., Moitinho, E. D. B., Cunha Sobrinho, A. P. Da, & Passos, O. S. (2002). “Tropical”: Uma nova seleção de tangerina “sunki”. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(1), 127-132. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000100028>
- Universidad de California Riverside (UCR). (2018). *Citrus variety collection*. Universidad de California Riverside. Consultada en julio de 2018 en <https://citrusvariety.ucr.edu/varieties.html>
- Vásquez Amariles, H. D. (2013). *Evaluación de Poncirus trifoliata var. monstruosa Flying Dragon como portainjerto enanizante para naranja y mandarina comparado con otros patrones*. [Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia]. Repositorio UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21789/7311008.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Villalba, D. (2000). *Patrones y variedades de cítricos. Apuntes de Cursos de Formación de Agricultores Cualificados* (3.^a ed. corregida). Generalitat Valenciana, Servicio de Desarrollo Tecnológico Agrario.

