

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACION *in vitro*  
DE SEMILLAS Y MERISTEMOS DE *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying  
Dragon)**

**ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR THE PROPAGATION OF SEEDS  
AND MERISTEMS IN VITRO OF *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying  
Dragon)**

Lorena Lozano Camargo<sup>1\*</sup>, Luis Vanegas Martinez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Ingeniería Agronómica. Universidad de Cundinamarca. Colombia, Bogotá – Calle 40 J # 78 B 30. Correo-e: [j.lorena.lozano.c@gmail.com](mailto:j.lorena.lozano.c@gmail.com) (\*Autor responsable).

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Ingeniería Agronómica. Universidad de Cundinamarca. Colombia – Fusagasugá, Cundinamarca – Diagonal 18 No. 20-29.

**Resumen**

El objetivo de la presente investigación, fue determinar el medio de cultivo más apropiado para la propagación *in vitro* de semillas y meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*, comúnmente conocido como Flying Dragon; para la propagación de semillas, se evaluó el porcentaje de germinación en campo y en cada uno de los medios de cultivo propuestos, los cuales fueron: medio Murashige & Skoog (M&S) sin hormona (tratamiento testigo), M&S suplementado con 0,01mg/L GA3, M&S suplementado con 0,1mg/L GA3, dos medios M&S suplementados con extracto de cebolla larga en diferentes concentraciones y M&S suplementado con 100ml/L de Agua de coco; para la propagación de meristemos, se evaluó el porcentaje de proliferación de brotes en los siguientes medios de cultivo: M&S (tratamiento testigo), M&S + 0,5mg/L BAP, M&S + 0,25mg/L BAP y M&S + 100ml/L de agua de coco.

Para comparar los resultados, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey, por medio del software estadístico Infostat, utilizando un diseño de bloques completos al azar.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencia significativa entre los medios de cultivo (tratamientos) empleados para la germinación de semillas *in vitro*, obteniéndose un máximo de germinación del 57,03% con el medio M&S + 100ml/L de agua de coco y un mínimo de 27,77% con el medio M&S + 0,1mg/L GA3, porcentajes muy bajos comparados con los obtenidos en campo, razón por la cual se sugiere la búsqueda de otros tratamientos para la germinación *in vitro* de Flying Dragon; por el contrario, los resultados obtenidos en la proliferación de brotes a partir de los meristemos de Flying Dragon, muestran que si se presentó diferencia estadística significativa entre los tratamientos propuestos, siendo el mejor tratamiento, el medio M&S + 0,5mg/L BAP con un porcentaje del 97,77% de brotes proliferados.

**Palabras clave:** Propagación, *in vitro*, semillas, meristemos, medios de cultivo, germinación, brotes.

## Abstract

The objective of this research it was to determine the most suitable cultivation media for in vitro propagation of seed and meristems of *Poncirus trifoliata* var. *monstrousa*, commonly known as Flying Dragon; for the seeds propagation, it was evaluated germination percentage in the field and each of the proposed cultivation media: Murashige & Skoog (M&S) without hormone (control treatment), M&S + 0.01 mg/L GA3, M&S + 0.1mg/L GA3, two media M&S + green onion extract in different concentrations and M&S + 100ml/L coconut water; for the propagation of meristems, were evaluated the percentage of shoot proliferation in the following cultivation media: M&S without hormone (control treatment), M&S + 0.5mg/L BAP, M&S + 0.25 mg/L BAP and M&S + 100ml/L coconut water.

For the analysis of results, analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, were made using the statistical software Infostat, using design randomized complete block.

The results showed no significant difference between the cultivation media (treatments) used for germination in vitro seeds, yielding a maximum germination of 57.03% with medium M&S + 100ml/L of coconut water and a minimum of 27.77% with M&S medium + 0.1mg/L GA3, very low percentages compared with those obtained in the field, which is why the search for other treatments for in vitro germination of Flying Dragon is suggested; on the contrary, the results obtained in shoot proliferation from meristem Flying Dragon, show that if presented statistically significant difference between the treatments proposed, being the best treatment, the M&S medium + 0.5mg/L BAP with a percentage of 97.77% of shoots proliferated.

**Keywords:** Propagation, *in vitro*, seeds, meristems, culture media, germination, shoots

## INTRODUCCIÓN

Los cítricos son los frutales de mayor producción e importancia a nivel mundial, debido al aumento progresivo de su consumo en fresco e industrialización. Pese a que son diversos los países donde se practica la citricultura, la FAO (2012) y CORPOICA (2008), reportan como mayores productores de cítricos del mundo a Estados Unidos, China y Brasil; siendo este último el mayor productor de cítricos frescos a nivel mundial (FAO, 2014, p. 13).

En Colombia, el cultivo de cítricos posee gran participación en el sector frutícola nacional. Cultivándose desde los 0 msnm hasta los 2200 msnm, actualmente, es el tercer frutal más producido en el país, con una participación del 20,4% en cuanto al área sembrada, y del 18,7% con respecto a la producción frutícola nacional (DANE, 2016, p. 18), lo que evidencia la importancia de este cultivo a nivel nacional.

La amplia distribución de enfermedades sistémicas ocasionadas por virus y viroides por medio de material de propagación infectado, son enfermedades que limitan la productividad, la calidad de la fruta y la vida útil de los árboles (CORPOICA, Agosto de 2006, p. 3), siendo necesaria la propagación de material vegetal de cítricos, mediante técnicas que garanticen la calidad fitosanitaria del material propagado.

Por medio del cultivo *in vitro*, se permite la propagación de material vegetal sano, manteniendo las características agronómicas deseadas a través del tiempo, siendo así, una de las técnicas más usadas para el saneamiento del material vegetal; además el cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos hace parte del procedimiento para la certificación de plantas de cítricos a nivel mundial, permitiendo a su vez, la obtención de plantas sanas, elevar el potencial de producción y aumentar la longevidad de las plantaciones (CORPOICA, Abril de 2006, p. 7); Motivo por el cual la presente investigación plantea el uso de esta técnica, para la propagación de material vegetal de la especie *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon), evaluando su comportamiento en diferentes medios de cultivo y con la intención de obtener material vegetal sano, se siembran semillas y meristemos de este cultivar.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Institución Educativa Distrital Francisco de Miranda, ubicado en la ciudad de Bogotá en el barrio Timiza. Durante la investigación se estableció en cultivo *in vitro*, semillas y meristemos axilares de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*; con el fin de identificar el medio óptimo para la propagación de cada tipo de material vegetal se realizaron observaciones semanales, hasta 2 meses después de realizada la siembra para determinar el porcentaje de germinación de las semillas en cada tratamiento y 1 mes después para el caso de los meristemos, para evaluar el porcentaje de explantes con proliferación de brotes.

### **Elaboración de medios de cultivo**

Para la propagación *in vitro* se elaboraron los medios de cultivo a evaluar los cuales se realizaron con base a lo propuesto por Murashige y Skoog (1962); se elaboraron las soluciones madre o soluciones stock y al momento de la elaboración de los medios, se extraía la cantidad deseada, de cada una de ellas, con la ayuda de una pipeta estéril, diferente para cada solución. Además de las soluciones madre, a los medios de cultivo se les adiciono: INOSITOL 100mg/L, SACAROSA 30g/L, AGAR 6-10g/L y hormonas, según el caso. Las hormonas empleadas (casa comercial SIGMA) y las alternativas en remplazo de las hormonas se adicionaron de la siguiente manera, teniendo en cuenta el tipo de material vegetal:

#### **Semillas:**

Tratamiento testigo: Sin hormona.

Tratamiento 1: 0,01mg/L GA3.

Tratamiento 2: 0,1mg/L GA3.

Tratamiento 3: 100ml/L Agua de coco.

Tratamiento 4: Extracto de cebolla larga  
3,7mg/L.

Tratamiento 5: Extracto de cebolla larga  
0,37mg/L.

#### **Meristemos**

Tratamiento testigo: Sin hormona

Tratamiento 1: 0,5mg/L BAP

Tratamiento 2: 0,25mg/L BAP

Tratamiento 3: 100ml/L agua de coco

Posterior a esto, a los medios de cultivo se les ajusto el ph a 5,8 – 6,0 con HCl y KOH y se llevaron a punto de ebullición para su homogenización; posteriormente se llevaron a la autoclave a 15psi durante 20 minutos para su esterilización.

Las semillas y las yemas utilizadas para la extracción de meristemos provienen del vivero “Frutales del Trópico” ubicado en el municipio de Fusagasugá Cundinamarca con registro ICA 25290-0528, el cual es productor y distribuidor del material vegetal *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* comúnmente conocido como Flying Dragon, información que puede ser consultada en el área de semillas y recursos fitogenéticos del ICA.

### **Desinfección y preparación del material vegetal**

Después de la recolección, el material vegetal fue llevado al laboratorio para realizar el protocolo de desinfección y el correspondiente alistamiento para la siembra.

Los frutos de Flying Dragon fueron lavados con agua y jabón en polvo; posteriormente se abrieron con un bisturí estéril y se extrajeron las semillas; las cuales se depositaron en un frasco de vidrio estéril y se llevaron a la zona de propagación, a la cabina de flujo laminar para su desinfección. Inicialmente se lavaron con una solución de agua destilada estéril y jabón antibacterial, agitando por 5 minutos y jugando tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente son lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, adicionando 1ml de Tween 20 por cada 100 ml de solución, agitando durante 5 minutos para finalmente ser jugadas tres veces, con agua destilada estéril.

Para la extracción de meristemos una vez ingresadas las plántulas al laboratorio, se toman las yemas eliminando las hojas, utilizando un bisturí estéril; posteriormente estas son depositadas en un frasco de vidrio esteril; las yemas son lavadas con agua y jabón en polvo, agitando por cinco minutos y jugando, posteriormente se llevan a la zona de propagación, a la cabina de flujo laminar, para realizar allí su desinfección. Las yemas son lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2% adicionando 1ml de Tween 20 por cada 100ml de solución, agitando durante 5 minutos y jugando tres veces con agua destilada estéril.

### **Propagación**

Para realizar la siembra del material vegetal, se desinfectaron todas las superficies de la zona de propagación y las cabinas de flujo laminar con hipoclorito de sodio y posteriormente con alcohol antiséptico para evitar la contaminación; las herramientas utilizadas: pinzas, bisturís, cajas de petri, servilletas y tabletas, fueron esterilizadas previamente en la autoclave, con el mismo objetivo.

### **Semillas**

Una vez terminado el protocolo de desinfección, las semillas se depositaron en cajas de petri las cuales contenían servilletas absorbentes y utilizando una pinza se depositaron en los medios de cultivo; posterior a la siembra se incubaron a 30°C. Por cada tratamiento (tipo de medio de cultivo) se realizaron 3 repeticiones, en cada repetición se sembraron 10 frascos de medio y en cada uno de ellos 3 semillas, para un total de 30 semillas por repetición y 90 semillas por tratamiento.

### **Meristemos**

Posterior a la desinfección, se tomó cada yema y se realizaron diferentes cortes con ayuda de un estereoscopio para realizar la extracción de cada meristemo. Cuidando la dirección, los meristemos se depositaron en los frascos con el medio de cultivo, los cuales se sellaron, marcaron y fueron llevados a la zona de incubación a temperatura ambiente 22-25°C.

Por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones, por cada repetición se sembraron 5 medios y en cada uno de ellos 3 meristemos, para un total de 15 meristemos por repetición.

Para el análisis de los resultados se realizaron pruebas de Tukey y análisis de varianza (ANOVA), por medio del software estadístico Infostat. El diseño utilizado fue el de bloques completos al azar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Evaluación del protocolo de desinfección de semillas y yemas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon).**

El protocolo de desinfección para cultivo *in vitro* debe asegurar la eliminación de cualquier tipo de agente patógeno sin dañar el material vegetal; entre los compuestos químicos más utilizados en este procedimiento, se encuentra el hipoclorito de sodio (NaCl), también llamado cloro en su forma comercial, utilizado en concentraciones que pueden ir del 2% al 5%. También se utilizan detergentes como el Tween 20 el cual rompe la tensión superficial y le permite al material vegetal tener mayor contacto con el compuesto químico utilizado (Abdelnour y Escalant, 1994, p. 18), razón por la cual los compuestos anteriormente mencionados fueron seleccionados para la elaboración del protocolo de desinfección de la presente investigación. Como se mencionó en la metodología, el protocolo de desinfección consistió en lavar el material vegetal con agua y jabón, para sumergirlos posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 2% la cual contenía 1ml de Tween 20 por cada 100ml de solución, agitando durante 5 minutos y jugando con agua destilada estéril.

La contaminación se presentó, producto del estado del ambiente, principalmente al momento de la elaboración de los medios de cultivo; es decir la contaminación fue exógena, lo cual corrobora que el protocolo de desinfección empleado para el material vegetal fue efectivo.

La asociación de hipoclorito de sodio y Tween 20, ha sido utilizada exitosamente en protocolos de esterilización de material vegetal para el cultivo *in vitro* de cítricos. Ejemplo de lo anterior es la microinjertación de cítricos, en cuyo protocolo de desinfección se utiliza hipoclorito de sodio y Tween 20, tanto para las semillas del portainjerto, como para las yemas de donde se extrae posteriormente el meristemo a ser microinjertado (IICA, 1994, p. 100). Martínez et al. (2006) emplearon un protocolo similar al usado en la presente investigación en la desinfección de semillas para la propagación *in vitro* de los patrones de cítricos *Citrus volkameriana*, *Citrumelo swingle* y C – 35, utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% y Tween 20 obteniendo porcentajes de germinación de hasta el 100% en sus tratamientos evaluados. Igualmente en el trabajo realizado por Santiana (2014), para el establecimiento *in vitro* de meristemos axilares de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.), los segmentos nodales, donde se encuentran los meristemos, son sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio y Tween 80, como parte de su protocolo de desinfección, del cual se obtiene como resultado el 70,6% de meristemos asépticos; resultado que contrasta con el de la presente investigación ya que pese a ser implementado en una especie de cítricos diferente, se obtuvo un 99% de meristemos asépticos.

## Germinación de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en cultivo *in vitro*.

Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron a los 60 días después de la siembra (dds) de las semillas, motivo por el cual con base en dicha información se realizó el análisis estadístico:

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Germinación	18	0,62	0,35	31,47

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2231,22	7	318,75	2,29	0,1135
Medios de cultivo	1700,63	5	340,13	2,44	0,1074
Bloque (Repetición)	530,59	2	265,29	1,91	0,1989
Error	1391,62	10	139,16		
Total	3622,84	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=33,45476

Error: 139,1619 gl: 10

Medios de cultivo	Medias	n
M&S + 100ml/L AC	57,03	3 A
M&S + 0,37mg/L EC	39,97	3 A
M&S Sin Hormona	36,90	3 A
M&S + 0,01mg/L GA3	34,40	3 A
M&S + 3,7mg/L EC	28,87	3 A
M&S + 0,1mg/L GA3	27,77	3 A

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Según el análisis de varianza aplicado, para niveles de confianza del 95% se obtiene un  $R^2$  el cual se define como el coeficiente de determinación de 0,62 lo cual implica que el análisis explica en un 62% la tendencia de los datos observados.

En el análisis se presenta una “*f calculada*” (F), tanto para los medios de cultivo, como para los bloques, las cuales fueron comparadas con la “*f tabulada*”, según los valores de la distribución F de Fisher para un nivel de confianza del 95%, a partir de las cuales se discutió si se presentó o no diferencia significativa entre los medios de cultivo o entre los bloques.

La “*f calculada*” (Fc) obtenida para los medios de cultivo (tratamientos) fue de 2,44 y la “*f tabulada*” (Ft) fue de 3,326; por lo tanto ya que  $F_c < F_t$  ( $2,44 < 3,326$ ), se establece que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos, pero ya que el valor arrojado por el  $R^2$  explica solo en un 62% el análisis, estos resultados se corroboran con test de Tukey. Igualmente, la “*f calculada*” (Fc) obtenida para los bloques (repeticiones) fue de 1,91 y la “*f tabulada*” (Ft) fue de 4,103; por lo tanto ya que  $F_c < F_t$  ( $0,92 < 5,143$ ), se establece que no existió diferencia estadística significativa entre los bloques.

La prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey se aplicó para determinar cuál de los medios de cultivo (Tratamientos) fue más efectivo, para la germinación de semillas de Flying Dragon en cultivo *in vitro*.

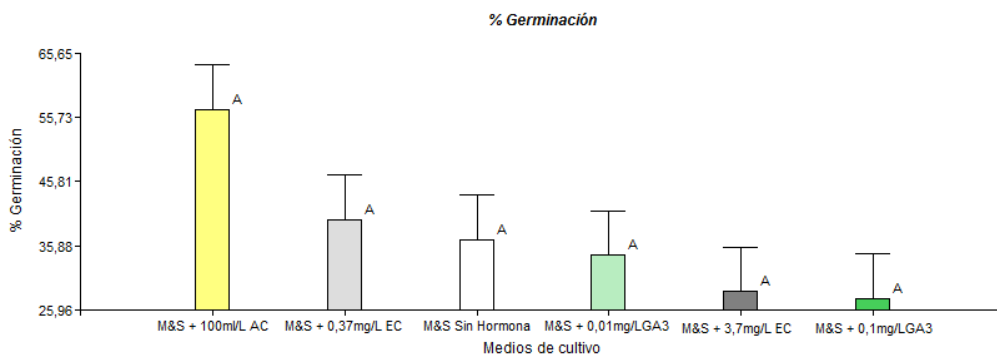
De acuerdo al Test de Tukey y como se evidencia en la Gráfica 1, para niveles de confianza del 95%, no se presenta diferencia significativa entre los medios de cultivo empleados para la germinación de semillas de Flying Dragon.

Pese a que no se presentó diferencia significativa, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el medio de cultivo M&S suplementado con 100ml/L de agua de coco, con un

porcentaje de 57,03%; lo cual es posible, debido a la presencia de reguladores de crecimiento que han sido previamente identificados dentro del agua de coco (Krikorian, 1991, p. 51).

El anterior planteamiento, ha sido comprobado en un extenso número de investigaciones, empleando agua de coco para la germinación de semillas. Entre las investigaciones realizadas en campo, cabe mencionar la realizada por Patiño, (2011) el cual, obtiene buenos resultados en la germinación de *Dracontium grayumianum*, gracias a la inmersión previa de las semillas en agua de coco, logrando un porcentaje de germinación del 50%, superior a la de los demás tratamientos empleados, entre los que también se encontraba el uso de ácido giberélico. Otro ejemplo del empleo de agua de coco, para la germinación de semillas, es la investigación realizada por Salazar, et al. (2013), donde obtuvieron un porcentaje en la germinación *in vitro* de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) del 95,1%, siendo el medio de cultivo más eficiente para la germinación, el medio Murashige & Skoog suplementado con agua de coco.

En cuanto al extracto de cebolla (EC), como evidencian las medias arrojadas por el test de tukey la mayor concentración de extracto (3,7mg/L), como la de GA3 (0,1mg/L), presentaron los menores porcentajes de germinación, los cuales estuvieron por debajo del 29%; igualmente las concentraciones de 0,01mg/L de GA3 y de 0,37mg/L del extracto, presentan un porcentaje de germinación similar, superior al 34%; estos resultados sugieren que la concentración de GA3 presente en el extracto de cebolla elaborado, fue similar a la encontrada por Díaz et al. (2013). Sin embargo, para corroborar la concentración de GA3 tanto en el extracto de cebolla, como en el agua de coco, habría que realizar un análisis para poder caracterizar y cuantificar los componentes presentes en dichos suplementos naturales, empleados en la elaboración de los medios de cultivo. Por esta razón Krikorian (1991) menciona que debido a la variabilidad e imprecisión de la composición del agua de coco y los diferentes extractos y aditivos naturales, muchos investigadores, han dejado de usarlos, como suplementos de los medios de cultivo.



**Gráfica 1.** Porcentaje de germinación 60 días después de la siembra de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2016).

### **Proliferación de brotes a partir de los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (Flying Dragon) en cada uno de los medios de cultivo propuestos.**

En todos los tratamientos se obtuvo el mayor porcentaje de proliferación de brotes a los 30 días después de la siembra (dds) de los meristemos, motivo por el cual con base a dicha información se realizó el análisis estadístico.

## Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
§Prolif. Brotes	12	0,98	0,97	11,79

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13727,66	5	2745,53	67,66	<0,0001
Bloque (R)	1,76	2	0,88	0,02	0,9786
Medio de Cultivo	13725,90	3	4575,30	112,75	<0,0001
Error	243,47	6	40,58		
Total	13971,13	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=18,00626

Error: 40,5775 gl: 6

Medio de Cultivo	Medias	n	
M&S + 0,5mg/L BAP	97,77	3	A
M&S + 0,25mg/L BAP	66,67	3	B
M&S Sin Hormona	47,23	3	C
M&S + 100ml/L AC	4,47	3	D

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Según el análisis de varianza aplicado, para niveles de confianza del 95% se obtiene un  $R^2$  de 0,98 lo cual implica que el análisis explica en un 98% la tendencia de los datos observados, considerando esto como muy aceptable.

En el análisis se presentan una “*f calculada*” (F), para los medios de cultivo, y otra para los bloques, las cuales fueron comparadas con la “*f tabulada*”, según los valores de la distribución F de Fisher para un nivel de confianza del 95%, a partir de las cuales se discutió si se presentó o no diferencia estadística significativa entre los medios de cultivo o entre los bloques.

La “*f calculada*” (Fc) obtenida para los medios de cultivo (tratamientos) fue de 112,75 y la “*f tabulada*” (Ft) fue de 4,757; por lo tanto ya que  $F_c > F_t$  ( $112,75 > 4,757$ ), se establece que si existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos, lo cual se corroboró con el test de Tukey. Por el contrario, la “*f calculada*” (Fc) obtenida para los bloques (repeticiones) fue de 0,02 y la “*f tabulada*” (Ft) fue de 5,143; por lo tanto ya que  $F_c < F_t$  ( $0,02 < 5,143$ ), se establece que no existió diferencia estadística significativa entre los bloques.

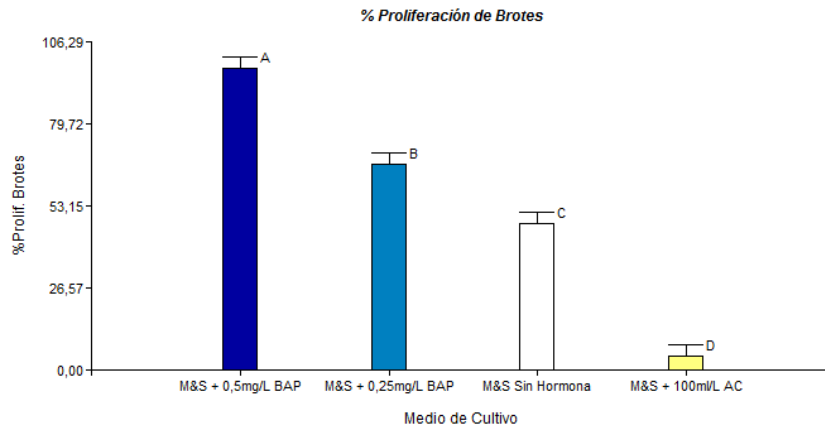
La prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey se aplicó para determinar cuál de los medios de cultivo (Tratamientos) fue más efectivo, para la proliferación de brotes, a partir de los meristemos de Flying Dragon.

De acuerdo al Test de Tukey y como se evidencia en la Gráfica 2, para niveles de confianza el 95% se presenta diferencia significativa entre todos los medios de cultivo empleados para la proliferación de brotes, siendo el medio de cultivo M&S suplementado con 0,5mg/L de Bencilaminopurina (BAP), el tratamiento más efectivo, con un 97,7% de brotes proliferados.

Estos resultados son similares a los alcanzados por Van Le et al. (1999), con *Poncirus trifoliata* Raf L., obteniendo una regeneración de brotes del 87% a partir de células ubicadas en los entrenudos de plántulas no mayores a un año, utilizando una concentración de BAP 25 $\mu$ M en el medio de cultivo. Igualmente Santiana (2014), obtiene un porcentaje máximo de proliferación de brotes en el 80% de los meristemos de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.), 28 días después de establecerlos en cultivo *in vitro*, utilizando



0,25mg/L BAP. Dicha situación comprueba la eficacia del uso de la Bencilaminopurina en la proliferación de brotes *in vitro* a partir de meristemos de cítricos, pero evidencia también que cada especie y protocolo presentan requerimientos nutricionales y condiciones específicas para su desarrollo mediante cultivo *in vitro*.



**Gráfica 2.** Porcentaje de proliferación de brotes 30 días después de la siembra de los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2016).

Así mismo el tratamiento que presentó el porcentaje más bajo de proliferación de brotes, fue el medio de cultivo M&S suplementado con 100ml/L de agua de coco, lo que supone que el agua de coco presenta un efecto inhibitorio, pues con este tratamiento se obtuvo un porcentaje de brotes mucho menor al obtenido con el medio de cultivo M&S sin ningún tipo de suplemento. Jarret (1991) menciona un resultado similar al obtenido en la presente investigación, al propagar por cultivo *in vitro*, meristemos de camote; en los resultados obtenidos en dicha investigación, el agua de coco reprimió tanto la proliferación de brotes como el crecimiento de raíces (p. 424); así mismo menciona que esto puede deberse a altas concentraciones de citoquininas presentes en el agua de coco, las cuales inhiben la formación de brotes (p. 431). Esta situación es difícil de comprobar, ya que el agua de coco es una solución, que puede variar tanto en el tipo de compuestos, como la cantidad; lo anterior depende de la fenología, fertilización, ubicación y un sinnúmero de características específicas de la planta de donde se extrajo el material vegetal (AC). Debido a esta variabilidad en la composición del agua de coco (AC), es difícil discutir el motivo por el cual su uso como suplemento en el medio de cultivo no favoreció la formación de brotes, inhibiendo el desarrollo de los meristemos de Flying Dragon.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios no solo por darme la vida y ser el artífice de la magnífica creación del universo, sino también por guiar y llenar mi camino de ángeles y excelentes seres humanos entre los que se encuentran a los que puedo agradecer por su colaboración en este proyecto.

A mis padres por permitirme crecer en un hogar lleno de amor y unión, por enseñarme que en una familia siempre se apoyan unos a otros, sin importar la situación y que por más grandes que sean los inconvenientes que se presenten en la vida, siempre hay que seguir adelante con la frente muy en alto.

A George, por ser el mejor asesor de tesis, amigo y compañero de vida, quien me ha permitido crecer a nivel personal e intelectual, a su lado, por vivir junto a mí, mil sueños y proponerse alcanzar muchas metas, a las cuales vamos llegando tomados de la mano. A su familia por acogerme en el corazón de su hogar y brindarme su cariño y apoyo incondicional, en especial a Gladis y Rafael por convertirse en mis padres adoptivos. Los quiero demasiado.

Al profesor Luis Eduardo Vanegas por su apoyo en la dirección de mi trabajo de grado; Al Vivero Frutales del Trópico, especialmente al señor Arcángel Romero, por facilitar sus instalaciones y el material vegetal para el desarrollo de esta investigación; A la Institución Educativa Distrital Francisco de Miranda, en especial al Rector Hernando Martínez Niño, por facilitarme el laboratorio de biotecnología, los equipos y reactivos sin los cuales no hubiera sido posible llevar a cabo la presente investigación; A Mercy Patricia Duque Arias y Sandra Helena Hernández Rangel, docentes de la IED Francisco de Miranda, por su colaboración y apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación, por su pasión y compromiso en educar y enseñar a los demás; quienes me brindaron los primeros conocimientos de esta ciencia, gracias a la cual encontré mi vocación.

## REFERENCIAS

- i. FAO. (Ed.). (2012). *Frutos Cítricos Frescos y Elaborados. Estadísticas anuales*. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. Revisado en: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS\\_BULLETIN\\_2012.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf)
- ii. CORPOICA. (Ed.). (2008). *Tecnología para el Cultivo de Cítricos en la Región Caribe Colombiana*. Magdalena, Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Estación Experimental Caribia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR.
- iii. FAO. (Ed.). (Octubre de 2014). Principales Novedades en los mercados y perspectivas a corto plazo. Comité de problemas de productos básicos. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. Revisado en: <http://www.fao.org/3/a-MK898S.pdf>
- iv. DANE. (Ed.). (Abril de 2016). 3<sup>er</sup> Censo Nacional Agropecuario. Décima Entrega de resultados 2014. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Revisado en: <http://www.dane.gov.co/files/CensoAgropecuario/entrega-definitiva/Boletin-10-produccion/10-Boletin.pdf>
- v. CORPOICA. (Ed.). (Agosto de 2006). *Fortalecimiento del proceso de certificación de cítricos para Colombia*. Palmira, Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Centro de Investigación Palmira.
- vi. CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (Ed), (Abril de 2006), *Bases para la certificación de plántulas de cítricos libres de enfermedades en Colombia*, Palmira, Valle del Cauca, Colombia, CORPOICA, Boletín divulgativo N° 21.
- vii. Murashige, T. y Skoog, F., (Julio de 1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. (15).

- viii. Abdelnour, A. y Escalant, J., (1994), *Catie*, Costa Rica, *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*, IICA.
- ix. IICA. (Ed.). (1994). *Seminario internacional sobre biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales, 26 al 30 de Septiembre de 1994*, Maracay, Venezuela, IICA.
- x. Martínez, M., López, A., Osorio, F., Gallardo, F., López, H. y Mata, M., (2006). Cultivo *in vitro* de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *SciELO*. 31 (8).
- xi. Santiana, W. (Noviembre de 2014). *Establecimiento in vitro de lima ácida (Citrus aurantiifolia [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares* (Tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.
- xii. Krikorian, A. (Mayo de 1991) Capítulo 3. Medios de cultivos: generalidades, composición y preparación. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 41 – 78). Cali, Colombia, CIAT.
- xiii. Patiño, C. (2011). Efecto inductor del agua de coco sobre la germinación de semillas y brotamiento de los cormos de la hierba de la hierba de la Equis *Dracontium grayumianum* G. Zhu & Croat. *Acta Biológica Colombiana*, (16), pp. 133 – 142.
- xiv. Salazar, A., Amaya, S. y Barrientos, A. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). (Spanish). *Revista Colombiana de Biotecnología*, (15), pp. 97 – 105.
- xv. Van Le, B., Thanh, N., Anh, L. y Trâm Thanh, K. (January 1, 1999). High frequency shoot regeneration from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) using the thin cell layer method. *Comptes Rendus De L'academie Des Sciences, Series III, Sciences De La Vie*, (322), p. 1105 – 1111.
- xvi. Santiana, W. (Noviembre de 2014). *Establecimiento in vitro de lima ácida (Citrus aurantiifolia [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares* (Tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.
- xvii. Jarret, L., (Mayo de 1991). Capítulo 18. Cultivo de tejidos de camote. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 421 – 446), Cali, Colombia, CIAT.