



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

JEIMY LORENA LOZANO CAMARGO

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FUSAGASUGÁ, COLOMBIA**

2016

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

JEIMY LORENA LOZANO CAMARGO

Director:

LUIS EDUARDO VANEGAS

Ingeniero Agrónomo

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FUSAGASUGÁ, COLOMBIA

2016

Nota de aceptación:

Presidente del jurado

Jurado (1)

Jurado (2)

Fusagasugá (2016)

DEDICATORIA

A mi padre y madre Carlos y Martha, quienes toda su vida han dado todo por mí, cuyo amor es el aliento, la fuerza vital y la razón de levantarme cada día deseando enorgullecerlos, para así poderles devolver algo de todo lo que me han brindado.

A mi padre, por ser el hombre más trabajador, amoroso y glotón que conozco; por convidarme de sus antojos y galguerías y heredarme ese singular amor por la comida; por tratarme siempre como su niña consentida, cumpliendo muchos de mis caprichos y dándome la razón en las peleas con mis hermanos aunque la mayoría de veces no la tuviera; por enseñarme que en esta vida no hay cosas imposibles y que todo tiene solución con excepción de la muerte, que todo lo que desees se puede conseguir, pero con esfuerzo, trabajo y sacrificio.

A mi madre, por decidir cuidarnos, educarnos y criarnos a mis hermanos y a mí, en vez de delegar nuestro cuidado a alguien más y cumplir sus metas personales; porque cuando sus hijos crecieron y pudieron valerse por sí solos, decidió trabajar y estudiar de nuevo, siendo el mayor ejemplo de mujer y superación que conozco; por educarme con los mejores valores y principios, por enseñarme que las mujeres son el sexo fuerte; por heredarme su genio y carácter, por apoyarme en todas y cada una de las decisiones que he tomado en la vida, siendo mi confidente y sin lugar a duda mi mejor amiga.

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. Los amo.

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 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 mi 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.

Gracias.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS.	VIII
LISTA DE GRÁFICAS.	IX
LISTA DE IMÁGENES.	X
LISTA DE ANEXOS.	XII
RESUMEN.	XIII
ABSTRACT.	XIV
1. INTRODUCCIÓN.	15
2. JUSTIFICACIÓN.	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
4. OBJETIVOS.	20
4.1 Objetivo General.	20
4.2 Objetivos Específicos.	20
5. MARCO TEÓRICO.	21
5.1 Generalidades del cultivo de cítricos.	21
5.2 Citricultura en Colombia.	21
5.3 Propagación de cítricos.	23
5.3.1 Propagación por injerto.	24
5.4 Cultivo <i>in vitro</i> o micropropagación.	25
5.4.1 Medios de Cultivo.	26
5.4.1.1 Reguladores de crecimiento.	26
5.4.1.2 Agua de coco y extractos vegetales.	27
5.4.2 Propagación <i>in vitro</i> de semillas.	28
5.4.3 Propagación <i>in vitro</i> de meristemos.	29
5.4.4 Propagación <i>in vitro</i> de cítricos.	30
5.6 <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon).	30
6. MATERIALES Y METODOS.	32

6.1 Localización.	32
6.2 Elaboración de medios de cultivo.	32
6.3 Recolección del material vegetal.	36
6.4 Desinfección y preparación del material vegetal.	38
6.5 Propagación del material vegetal.	40
6.6 Siembra en vivero.	43
6.7 Diseño experimental.	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
7.1 Evaluación del protocolo de desinfección de semillas y yemas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon).	45
7.2 Germinación de las semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en cultivo <i>in vitro</i>	46
7.3 Germinación de semillas en campo.	51
7.4 Proliferación de brotes a partir de los meristemos de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon).	53
8. CONCLUSIONES.	58
9. RECOMENDACIONES.	59
10. ANEXOS.	60
11. BIBLIOGRAFÍA.	63

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Composición de soluciones Stocks del medio de cultivo Murashige y Skoog.....	33
Tabla 2. Porcentaje de germinación de las semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en cultivo <i>in vitro</i> durante el tiempo de evaluación (Lozano, 2016).	47
Tabla 3. Porcentaje de germinación de las semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en campo, durante el tiempo de evaluación (Lozano, 2016).....	51
Tabla 4. Porcentaje de proliferación de brotes en los meristemas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en cada uno de los medios de cultivo propuestos.....	53

LISTA DE GRÁFICAS

	Pag.
Gráfica 1. Área cosechada y producción de cítricos en Colombia 2000 – 2013 (www.agronet.gov.co)	22
Gráfica 2. Rendimiento del cultivo de cítricos en Colombia 2000 – 2013 (www.agronet.gov.co)	23
Gráfica 3. Porcentaje de germinación 60 días después de la siembra de las semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2016).....	50
Gráfica 4. Velocidad y porcentaje de germinación de las semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2016).....	51
Gráfica 5. Porcentaje de proliferación de brotes 30 días después de la siembra de los meristemos de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2016).....	55

LISTA DE IMÁGENES

	Pag.
Imagen 1. Soluciones Stock para la elaboración de los medios de cultivo (Lozano, 2015).....	33
Imagen 2. A. Balanza analítica para el pesaje los reactivos, B. Micropipeta y C. Agar utilizados para la elaboración de los medios de cultivo (Lozano, 2015).....	34
Imagen 3. Extracción de agua de coco para la elaboración de los medios de cultivo (Lozano, 2015).....	35
Imagen 4. Elaboración de los medios de cultivo. A toma de pH, B plancha de calentamiento y agitación para la homogenización de los medio y C su posterior envase en frascos de vidrio, antes de autoclavarlos (Lozano, 2015).....	36
Imagen 5. A y B. Autoclave para la esterilización de los medios de cultivo y los demás implementos utilizados en la siembra (Lozano, 2015).....	36
Imagen 6. Vivero “Frutales del Trópico” (Lozano, 2016).....	37
Imagen 7. A – B Plantas madre y C frutos para la obtención de semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2015).....	37
Imagen 8. A Casa malla y B plántulas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2015).....	38
Imagen 9. A Elementos necesarios B – C y procedimiento para la extracción de semillas de Flying Dragon (Lozano, 2015).....	38
Imagen 10. A, B, C y D Procedimiento para la desinfección de las semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2015).....	39
Imagen 11. A Plántula y B – C proceso de extracción de yemas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) para realizar el protocolo de desinfección (Lozano, 2015).....	39

Imagen 12. A y B Desinfección de yemas para la extracción de meristemos (Lozano, 2015).....	40
Imagen 13. A y B Siembra de semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en los medios de cultivo, proceso realizado en cabina de flujo laminar (Lozano, 2015).....	41
Imagen 14. A y B Semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en cultivo <i>in vitro</i> (Lozano, 2015).....	41
Imagen 15. A, B, C Extracción de meristemos de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> y D su siembra en los medios de cultivo (Lozano, 2015).....	42
Imágenes 16. A, B, C, Proceso de extracción y D – G meristemos de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Vista Estereoscopio) (Lozano, 2015).....	43
Imagen 17. A – B Recolección y C extracción de semillas para la siembra en el vivero.....	43
Imagen 18. A Semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) con fungicida y B su siembra en condiciones <i>ex vitro</i>	44
Imagen 19. A, B, C y D. Temperatura en el sustrato empleado para la germinación en campo de Flying Dragon.....	44
Imagen 20. A, B, C, D, E y F Germinación de semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en cultivo <i>in vitro</i> (Lozano, 2016).....	46
Imagen 21. A y B Germinación de semillas de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) en campo (Lozano, 2016).....	52
Imagen 22. A, B y C Proliferación de brotes a partir de los meristemos de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Lozano, 2016).....	57
Imagen 23. A, B, C, D, E y F Proliferación de brotes a partir de los meristemos de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon) (Vista con Estereoscopio) (Lozano, 2016).....	57

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Cotización semilla de <i>Poncirus trifoliata</i> var. <i>monstruosa</i> (Flying Dragon).....	60
Anexo 2. Valores F de la distribución F de Fisher para 95% de confianza.....	61
Anexo 3. Contaminación en los medios de cultivo.....	62

RESUMEN

La presente investigación, es una tesis de pregrado, donde se evaluaron diferentes medios de cultivo para la propagación *in vitro* de semillas y meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*, comúnmente conocido como Flying Dragon, con el fin de generar un protocolo para la propagación *in vitro* de este cultivar; para la propagación de semillas, se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas 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 sin hormona (tratamiento testigo), M&S suplementado con 0,5mg/L BAP, M&S suplementado con 0,25mg/L BAP y M&S suplementado con 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 suplementado con 100ml/L de agua de coco y un mínimo de 27,77% con el medio M&S suplementado con 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 suplementado con 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

This research is a undergraduate thesis where different cultivation means were evaluated for *in vitro* propagation of seed and meristems *Poncirus trifoliata* var. *monstrousa*, commonly known as Flying Dragon in order to generate a protocol for *in vitro* propagation of this cultivar; for the seeds propagation, were evaluated germination percentage of the seeds in the field and each of the proposed means culture of which : Murashige & Skoog (M&S) without hormone (control treatment), M&S supplemented with 0.01 mg/L GA3, M&S supplemented with 0.1mg/L GA3, two media M&S supplemented with green onion extract in different concentrations and M&S supplemented with 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 supplemented with 0.5mg/L BAP, M&S supplemented with 0.25 mg/L BAP and M&S supplemented with 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 supplemented with 100ml/L of coconut water and a minimum of 27.77% with M&S medium supplemented with 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 supplemented with 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, debido a que se consumen de igual manera en los cinco continentes y se cultivan en casi todos los países donde se encuentren las condiciones necesarias para su desarrollo, gracias a su alta adaptabilidad a las condiciones climáticas. 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, logrando ocupar el puesto 30 en la producción de cítricos a nivel mundial con 957.000 Toneladas producidas en 55.000 hectáreas sembradas logrando una participación del 1,8% en el total de área sembrada en cultivos permanentes del país (CORPOICA, Agosto de 2006, p. 3).

Cultivándose desde los 0 msnm hasta los 2200 msnm, la producción de cítricos se ha distribuido por diversas zonas del país y variado a través de los años, aumentando tanto en el porcentaje de área sembrada, como en su participación en cultivos permanentes, en los años comprendidos entre 1992 y 2003 (Martínez y Espinal., 2005, p. 21, 54).

Pese a lo anterior, las cifras correspondientes a años posteriores reflejan que la producción de cítricos en el país ha ido disminuyendo.

Para el año 2010 el cultivo de cítricos tuvo una participación del 1,38% en la producción de cultivos permanentes; el área sembrada al igual que la producción disminuyeron entre los años 2007 y 2010, situación ocasionada por diferentes fenómenos como la ola invernal, sostenida desde el año 2007, que trajo consigo la importación de varias toneladas de cítricos desde Venezuela, Ecuador y Estados Unidos que consigo podían traer plagas y enfermedades generando mayores riesgos para la citricultura del país (Aguilar et al., 2012, p. 19).

Es de resaltar que otros fenómenos de tipo antrópico, también influyen la disminución de la producción de cítricos, entre estos fenómenos se pueden señalar la alta dispersión geográfica de la producción, la especulación agrícola, la falta de gestión empresarial y un pobre desarrollo tecnológico para el sector. (Aguilar et al., 2012, p. 20).

Actualmente, el cultivo de cítricos 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, pese a las dificultades que presenta su producción.

Además de las problemáticas anteriormente mencionadas, la amplia distribución de enfermedades sistémicas ocasionadas por virus y viroides por medio de material de propagación infectado, enfermedades que limitan la productividad, la calidad de la fruta y la vida útil de los árboles (CORPOICA, Agosto de 2006, p. 3), se hace necesaria la propagación de material vegetal 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.

JUSTIFICACIÓN

Entre 2000 y 2012, la producción de cítricos en Colombia creció 61%, esto debido al aumento de los rendimientos en los cultivos ya establecidos y no al aumento del área sembrada. Actualmente se cultivan cítricos en 20 departamentos del país, sin embargo la producción se encuentra concentrada; en el Valle del Cauca se localiza el 37% de la producción total de cítricos del país, Antioquia y los departamentos del eje cafetero, suman el 72% de la producción, dejando solo el 1% para los departamentos restantes.

Los departamentos con mayor producción poseen mayores niveles de ingresos y por ende menores niveles de pobreza, lo cual sumado a la generación de empleos y que desde 2006 hasta 2011 el valor de la producción de cítricos aumento un 70%, evidencia de la importancia social y económica de este cultivo (Ramírez et al., 2014, p. 30).

Las enfermedades virales, son problemas de tipo agronómico que disminuyen la producción y la calidad de los productos obtenidos, son de difícil manejo y ocasionan gran afectación en los cultivos; para el caso de los cítricos: la psorosis, leprosis, moteado de la hoja de los cítricos (Citrus leaf blotch), agallas de la madera (Vein enation-Woody gall), enanismo del citrange (Tatter leaf-Citrange stunt) y la tristeza de los cítricos (CTV), (Peña et al., 2004, p. 1), entre otras; estas enfermedades se presentan como una gran limitante para la citricultura, teniendo en cuenta que la multiplicación de cítricos se realiza por vía asexual y este es uno de los principales medios de propagación de estas y otras enfermedades, en especial las de tipo vascular.

Como se mencionó anteriormente, la propagación de material vegetal enfermo y las malas prácticas que se realizan en este proceso, son una de las principales causas de la diseminación de los problemas fitosanitarios (Martínez et al., 2005, p. 26), razón por la cual, la obtención de material vegetal sano para la producción de cítricos se convierte en una necesidad tanto para viveristas como para los productores de cítricos del país; motivo por el cual en esta investigación se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de un cultivar de cítricos.

La presente investigación se realizó mediante cultivo *in vitro*, ya que esta técnica posee diversas aplicaciones en la agricultura, siendo una de las más importantes, la obtención de plantas libres de patógenos.

La especie o cultivar seleccionado para la investigación fue *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* comúnmente conocido como Flying Dragon, el cual es un patrón de cítricos que presenta características agronómicas óptimas, puesto que es un patrón enanizante (la copa mide menos de 1,80 mt.), resistente a CTV, xiloporosis, exocortis, psorosis, phytoptora, con dicho patrón, se obtiene una buena producción y calidad de la fruta (Vasquez, 2013, p. 22); motivo por el cual su semilla posee un alto valor económico (ver anexo 1.).

En general, actualmente no se posee suficiente información en cuanto a este cultivar y su propagación, mediante el uso de esta técnica; en esta investigación también se buscó la propagación de material vegetal sano, por medio de la propagación de semillas y meristemos axilares, protocolo utilizado en la limpieza fitosanitaria de material vegetal, donde Corpoica, por medio del cultivo *in vitro*, ha obtenido plantas de cítricos libres del virus de la Tristeza.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La propagación de cítricos por vía vegetativa trae consigo la propagación de material vegetal enfermo, siendo una de las principales causas de la dispersión de enfermedades viróticas y los diversos problemas fitosanitarios actuales en el país. Algunas de las enfermedades viróticas y de micoplasmosis importantes son: la tristeza, la psoriasis, exocortis, xyloporosis, el cristacortis, la impietratura, el stubborn, la cancrrosis, erwinia y alternaría; la mayoría de estas enfermedades se propaga por injerto. Para contrarrestar estas problemáticas, las alternativas tecnológicas en Colombia son muy generales, con bajos niveles de adopción y no se encuentran particularizadas para cada variedad; existen limitaciones en cuanto a la investigación y transferencia de la misma; este conjunto de limitaciones genera producciones costosas y poco competitivas (Martínez et al., 2005, p. 25).

La problemática en cuanto a la propagación de material vegetal enfermo, se puede evidenciar varios años después de establecida la plantación, dado el largo periodo juvenil del cultivo de cítricos y el tiempo que tarda en entrar en producción; esto implica un riesgo para los productores; situación que se podría evitar mediante la consecución de material vegetal sano, el cual inicia mediante el empleo de semilla de patrones certificada, yemas certificadas, exhaustivo control de plagas y enfermedades, supervisión e implementación de herramientas tecnológicas que garanticen la confiabilidad del proceso de producción (Caicedo y Gómez., 2006, p. 6).

OBJETIVOS

Objetivo general.

Establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de semillas y de meristemas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon).

Objetivos específicos

1. Evaluar un protocolo de desinfección de semillas y yemas del patronaje Flying Dragon.
2. Analizar estadísticamente el porcentaje de germinación de semillas y el porcentaje de meristemas de Flying Dragon con proliferación de brotes en los diferentes medios de cultivo propuestos (tratamientos).
3. Determinar si los medios de cultivo y las condiciones evaluadas, son apropiadas para el desarrollo de semillas y de meristemas de Flying Dragon en cultivo *in vitro*.

MARCO TEORICO

Generalidades del cultivo de cítricos

Se denomina cítricos a una serie de plantas con características similares pertenecientes a la familia *Rutaceae*, este nombre se debe a que la mayoría de las plantas comprendidas en este grupo pertenece al género botánico *Citrus*, aunque también se incluyen especies de importancia de otros géneros como *Poncirus*, *Fortunela*, entre otros (Morin, 1965, p. 11).

Los cítricos provienen del Noroeste de India y territorios próximos de China y Bruma, de allí se han dispersado a todo el mundo. La cantidad de especies de cítricos, su facilidad de cruzamiento y autotetraploidia, sumado a la particularidad que poseen de poder hibridarse entre sí y la buena afinidad entre sí de diferentes especies a la injertación, permiten que exista prácticamente una especie apropiada para cada clima tropical (Peña, s.f, p. 6)

Agustí (2012) describe que los cítricos se cultivan en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios, llegando a ser actualmente el frutal de mayor producción a nivel mundial; menciona también que para el año 2001, la producción de cítricos estuvo cercana a los 81 millones de toneladas, siendo Brasil y Estados Unidos los mayores productores del mundo, con más de 16 millones de toneladas cada uno.

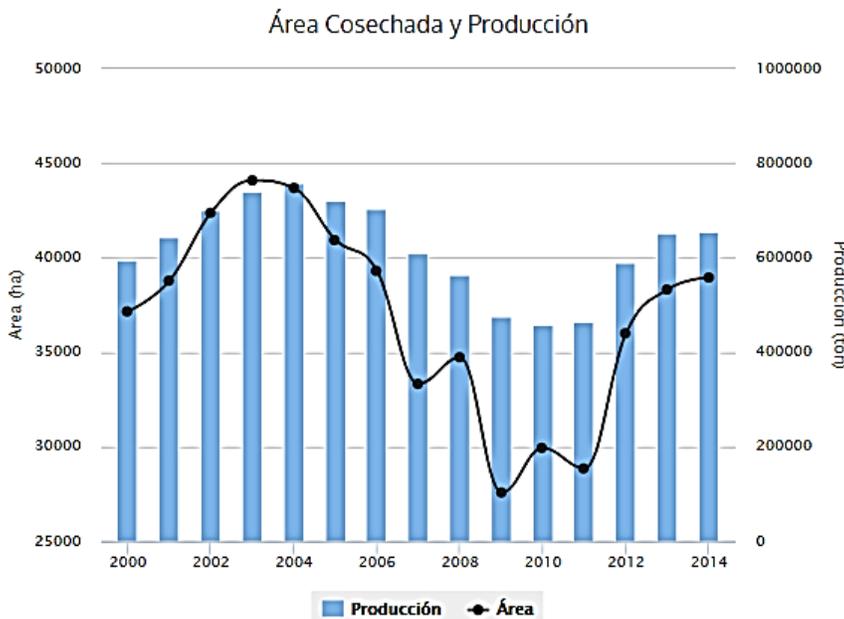
Citricultura en Colombia

Según la encuesta Nacional Agropecuaria del año 2010, en Colombia existían 62.409 Hectáreas dedicadas a la producción de cítricos, siendo el frutal más cultivado para consumo interno, obteniéndose entre ochocientos mil y un millón de toneladas al año (Ordúz y Mateus, 2012, p. 50).

La dinámica de la producción de cítricos en Colombia está mayoritariamente relacionada con el cultivo de naranjas, mandarinas y lima acida (lima-limón); dicha producción se encuentra dispersa por todo el país en 22 departamentos. Pese a que las estadísticas nacionales se encuentran registradas por departamentos, se puede analizar la dinámica de la citricultura del país por regiones, agrupándolas en cuatro grupos productivos que

son: Núcleo Centro-Oriente: (Santander, Norte de Santander, Boyacá, Cundinamarca, Tolima y Huila), Núcleo Sur-Occidente (Caldas, Risaralda y Quindío, Antioquia, Valle del Cauca y Nariño), Núcleo Costa Atlántica (Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Sucre, Magdalena y La Guajira) y Núcleo Orinoquía: (Meta y Casanare) (Roldan y Salazar, 2002, p. 14).

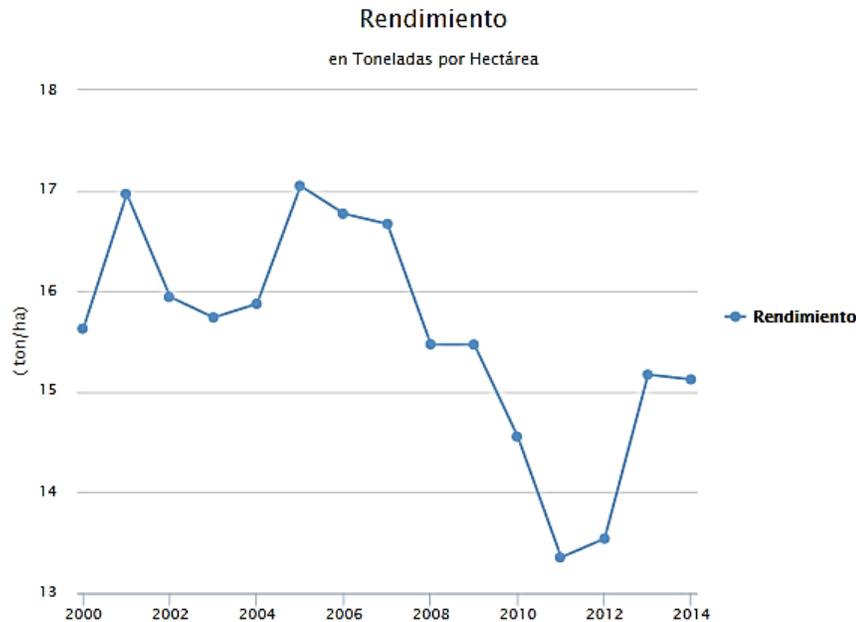
Como se observa en la gráfica 1., el área sembrada y la producción de cítricos en Colombia han descendido en los últimos años; a partir del año 2000, el pico más alto en cuanto a producción se presentó en el año 2004 con 758.565,90 ton, pese a que en este año no se tuvo el mayor rendimiento por hectárea, a esta producción aportaron 18 departamentos, de los cuales Santander y Cundinamarca obtuvieron la mayor participación nacional con el 18,9% y el 12,74% respectivamente. Posterior a este año, tanto el área cosechada como la producción disminuyeron, llegando a tan solo 459.150,65 ton producidas en 2010; a partir del año 2012, esos parámetros han aumentado progresivamente sin poder llegar a los valores alcanzados en 2004 (www.agronet.gov.co).



Gráfica 1. Área cosechada y producción de cítricos en Colombia 2000 – 2014 (www.agronet.gov.co).

Por otro lado, en la gráfica 2., se evidencia que entre los años 2000 a 2014, el mayor rendimiento del cultivo de cítricos en Colombia, se presentó en el año 2005, con

17,05ton/Ha; al igual que la producción y el área cosechada, el rendimiento decayó en años posteriores, presentando el menor valor en 2011, con 13,36 ton/Ha, y aunque a partir del año 2012, el rendimiento ha presentado un incremento a través de los años, dichos valores no se aproximan a los logrados en el año 2005 (www.agronet.gov.co).



Gráfica 2. Rendimiento del cultivo de cítricos en Colombia 2000 – 2014 (www.agronet.gov.co).

De acuerdo con el Dane (Abril de 2016) los mayores departamentos productores para el año 2014 fueron: Santander, Caldas, Meta, Tolima y Valle del Cauca, quienes a su vez concentraron el 47% del área cosechada.

Propagación de cítricos

Los cítricos se pueden propagar de dos formas, por vía sexual y asexual. Como resultado de la propagación sexual se obtienen plantas vigorosas y de mayor longevidad, sin embargo estas plantas necesitan de un mayor tiempo para entrar en producción. Estas plantas son altamente vulnerables a patógenos del suelo y presentan diferencias en cuanto a su apariencia, tamaño y calidad de fruta (CORPOICA, 2008, p. 31).

La propagación más común es la vegetativa o propagación asexual, ya que permite el uso de las características de tolerancia a enfermedades, salinidad y problemas de humedad, entre otros atributos; las especies con estas características son usadas como patrones, donde se injertan variedades con las características deseadas, principalmente de producción y calidad de la misma, con este tipo de propagación se permite una entrada más rápida en producción, se obtienen plantas de menor tamaño, lo que facilita su manejo en cultivo, a la vez que dependiendo del patrón, permite modificar la densidad de plantas por área (CORPOICA, 2008, p. 32).

La propagación asexual de cítricos, también presenta algunos inconvenientes, entre ellos y tal vez el más importante es la amplia difusión de enfermedades, como resultado de la propagación de material infectado; por este motivo, entidades como Corpoica, Colciencias y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural han aportado recursos, para fortalecer la infraestructura de casas malla, laboratorios, dotar de equipos, mejorar la formación de personal técnico en actividades de microinjertación, diagnóstico serológico y molecular e implementar procesos de certificación (CORPOICA, Agosto de 2006, p. 3).

Propagación por injerto

La propagación por injerto se basa en el trasplante de una yema la cual se toma de una planta seleccionada (planta madre) y se acopla a un patrón, obteniéndose así una nueva planta, la cual posee el sistema radicular del patrón y la parte aérea de la planta injertada. Existen diferentes tipos de injertación, el método usado, depende de la adaptación del propagador, del clima y el tipo de material vegetal utilizado. Los tipos de injertación más comunes son el de yema o escudete usado en patrones tiernos y el de púa o incrustación, utilizado principalmente la renovación de copas de plantas adultas (Morin, 1965, p. 106).

Al momento de establecer una plantación de cítricos, es importante conocer las características y el comportamiento de los patrones a utilizar, dependiendo de las condiciones climáticas, los suelos y los principales problemas fitosanitarios, ya que no son los mismos para cada región productora. El uso de patrones trae consigo diversas

ventajas, entre las que se cuentan: precocidad en la producción, una mayor uniformidad en la plantación, control y proyección sobre la cantidad y calidad de la cosecha dependiendo de la variedad, adaptación a problemas fisicoquímicos del suelo, sequía y tolerancia a plagas y enfermedades (COPOICA, 2008, p. 26).

Las plantas certificadas de portainjertos o patrones de cítricos, se pueden propagar a partir de semillas, esquejes o por cultivo *in vitro* (micropropagación), cual sea el caso, siempre la propagación se debe realizar en un ambiente protegido, como las casa malla o los invernaderos.

En el caso de la propagación por semillas, las plantas de donde proviene el material de propagación (plantas madre) pueden estar sembrados en campo, en huertos comerciales, deben estar libres de patógenos, producir frutos típicos de la variedad y encontrarse registrados ante la autoridad competente.

La propagación de patrones por esquejes se realiza principalmente por la falta de semilla certificada de las variedades y en cultivares monoembriónicos. Las ventajas de este tipo de propagación son la obtención de patrones con mayor rapidez, inducción de la precocidad de la producción y el manteniendo de las características genéticas del cultivar original (Oliveira et al., 2008, p. 18).

La micropropagación o cultivo *in vitro* de patrones de cítricos es una técnica biotecnológica que se emplea principalmente con el objetivo de obtener plantas sanas, pues es la vía más útil para establecer los programas de producción y certificación de patrones (Rojas, 2001, p. 4).

Cultivo *in vitro* o micropropagación

El cultivo *in vitro* es una técnica de propagación de material vegetal, la cual consiste en sembrar una parte de la planta (explante o inoculo), en un laboratorio, con el fin de proveerle artificialmente todas las condiciones necesarias para que sus células expresen su potencial intrínseco y así se puedan regenerar en un individuo completo. Esta técnica requiere que todos los procedimientos se realicen de forma aséptica para evitar la contaminación por cualquier tipo de patógeno (Rojas et al., 2004, p. 31).

El cultivo *in vitro* lleva su nombre, debido a que se siembra en frascos de vidrio; como sucede en los demás métodos de propagación asexual, las plantas o individuos obtenidos, son clones de la planta madre (de donde proviene el explante), es decir individuos genéticamente idénticos a su progenitora, con excepción de las plantas propagadas por semillas por medio de esta técnica, ya que cada una tiene su propia base genética.

El cultivo *in vitro* ha tenido gran aceptación en la industria, esto se debe a las ventajas que presenta respecto a los métodos tradicionales de propagación, algunas de estas ventajas son: el alto número de plantas obtenidas de un genotipo, por lo que con pocas plantas donadoras del explante (plantas madre) se pueden obtener hipotéticamente un número infinito de plantas, es menor el tiempo con el que se realiza la multiplicación o propagación de plantas, presenta la posibilidad de multiplicar un alto número de plantas en espacios reducidos, permite mayor control fitosanitario del material propagado; se puede multiplicar rápidamente una variedad de la que existan pocos individuos, entre otras (Abdelnour y Escalant, 1994, p. 2).

Medios de cultivo

Para poder desarrollarse bajo cultivo *in vitro*, el explante requiere diferentes nutrientes, los cuales son proporcionados en el medio de cultivo. La mayoría de los tejidos o explantes se pueden desarrollar en un medio que contiene mezclas de sales minerales y sacarosa como fuente de energía, otros tejidos requieren que el medio de cultivo sea complementado o enriquecido con vitaminas o reguladores de crecimiento, para su desarrollo (Krikorian, 1991, p. 42).

Reguladores de crecimiento

Además de los elementos minerales, para poder crecer y desarrollarse, las plantas requieren de algunas sustancias orgánicas denominadas hormonas o reguladores de crecimiento, las cuales promueven, pero también pueden inhibir el crecimiento; el efecto de los reguladores de crecimiento depende principalmente de su concentración, pues en cantidades muy pequeñas pueden estimular el crecimiento, pero en grandes cantidades, poseen un efecto inhibitor (Müller, 1964, p. 109).

Dependiendo de los resultados deseados, en la mayoría de los medios de cultivo para cultivo *in vitro*, es necesario adicionar reguladores de crecimiento entre los que se encuentran auxinas como el Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido Indolacético (AIA), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 – D) y el Ácido Indolbutírico (AIB), citoquininas entre las cuales se encuentra la Bencilaminopurina (BAP) y de las cuales la más usada es la Kinetina (KIN) y las Giberilinas, principalmente el Ácido Giberélico (GA3) (Roca y Mroginski, 1991, p. 32).

Algunas funciones de los reguladores de crecimiento son:

Las auxinas favorecen el crecimiento, promoviendo la elongación celular, controlan los tropismos de las plantas gracias a su efecto sobre tallos y raíces, mantienen la dominancia apical, también actúan sobre la formación de flores y frutos y en la diferenciación del sistema vascular de las plantas (Jordán y Casaretto, 2006, p. 9).

Las citoquininas promueven la división celular, estimulan la organogénesis y la androgénesis, retrasan la senescencia, activan las yemas laterales que se encuentran en dormancia y provocan la iniciación de brotes (Jordán y Casaretto, 2006, p. 21).

Las Giberelinas promueven la floración y el desarrollo de frutos, inducen el crecimiento en altura de las plantas y la germinación de las semillas, (Jordán y Casaretto, 2006, p. 16).

Para el desarrollo de la presente investigación, se utilizó el ácido giberélico (GA3) y la Bencilaminopurina (BAP).

Extractos vegetales y agua de coco

Existe gran variedad de sustancias de composición indefinida las cuales son usadas para enriquecer los medios, entre dichas sustancias se encuentra la pulpa de banano, la caseína, el jugo de naranja, de tomate, el agua de coco, entre otras (Abdelnour y Escalant, 1994, p. 10).

El agua de coco es una de las sustancias de enriquecimiento a los medios más utilizadas, ya que pese a ser una sustancia indefinida (composición química no definida), posee un

alto contenido de citoquininas, además es relativamente económica y fácil adquirir (IICA, 1987, p. 53). Ha sido utilizada para la producción y maduración de embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991, p. 145), en la germinación y desarrollo de protocormos *in vitro* de orquídeas como *Rossioglossum grande* (Bertolini, et al., 2014, p. 1), para inducir enraizamiento en plántulas obtenidas *in vitro*, en la regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares, para la formación de callo a partir de tejidos vegetales (Pérez, 1991, p. 559), en el cultivo de ápices meristemáticos de tallos y raíz de camote (Jarret, 1991, p. 426) y otras aplicaciones, que junto con las ya mencionadas ratifican la importancia de su uso en la propagación por cultivo *in vitro*.

Los extractos vegetales también pueden ser utilizados para enriquecer los medios de cultivo, pese a desconocerse su composición química y las variaciones que presentan dependiendo de la etapa fisiológica del material, las condiciones de su crecimiento y la variedad o el cultivar utilizado (Roca, 1980, p. 21), han sido implementados en los medios de cultivo para sustituir el uso de reguladores de crecimiento ya que presentan características similares al agua de coco, en cuanto a su costo y fácil adquisición.

Ejemplo del uso de los extractos vegetales como sustituto de los reguladores de crecimiento, es el estudio realizado por Díaz, Henao y Ramírez (2013), donde se comprobó el uso de residuo agrícola de la cebolla larga *Allium fistulosum*, como fuente de ácido giberélico, para la germinación de semillas de lechuga; en los resultados obtenidos en esta investigación se comprueba que el extracto de cebolla larga actuó de manera similar al patrón de ácido giberélico comercial utilizado, promoviendo la germinación de las semillas; estudios como este fortalece el uso de los extractos vegetales como alternativa a las hormonas o reguladores de crecimiento comerciales, no solo para su uso en campo, sino también para cultivo *in vitro*.

Propagación *in vitro* de semillas

La propagación *in vitro* de semillas, proporciona a los agricultores, material vegetal de siembra de alta calidad genética y fitosanitaria pues esta técnica además de servir como método de propagación, es también un medio de conservación y uno de los primeros pasos para la certificación de material vegetal (FAO, 2000, p. 190, 192).

La propagación *in vitro* de semillas y embriones ha demostrado grandes ventajas en diferentes tipos de material vegetal, en las orquídeas por ejemplo, donde la semilla posee un embrión de tamaño reducido y una masa de algunos cientos de células, dependiendo de nutrientes externos para poder germinar, en el caso de semillas latentes o que por la síntesis de algunas sustancias inhibitoras esta no pueda germinar (Villalobos y Thorpe, 1991, p. 111).

En el caso de los cítricos, la propagación *in vitro* de semillas se realiza principalmente para la propagación de semillas de patrones, con el fin de realizar procesos de microinjertación, siendo este uno de los requisitos implementados por CORPOICA, para la certificación y limpieza fitosanitaria de cítricos en Colombia (Caicedo y Muñoz, 2006, p. 10).

Propagación *in vitro* de meristemos

La propagación de meristemos tanto axilares como apicales, se ha empleado con éxito en diversas especies, su principal importancia radica en la obtención de plantas libres de virus, permitiendo la microinjertación; pese a su complejidad para la obtención de un individuo completo, puesto que para desarrollar esta técnica, el explante debe superar inconvenientes como la oxidación, la presencia de sustancias que inhiban el enraizamiento y razón por la cual debe suministrársele al explante un medio de cultivo muy específico y la sobrevivencia al ingresar a condiciones autótrofas, en las que el individuo debe poder desarrollarse de manera natural; esta técnica ha sido implementada en especies como el durazno *Prunus pérsica*, varios cítricos, entre otras (Mosella y Ascui, 1991, p. 514).

La obtención de plantas libres de virus por medio de esta técnica, se hace posible debido a que los virus no se distribuyen de la misma forma por toda la planta, algunos se limitan al floema, en pocos casos a las células paranquimáticas adyacentes, otros involucran a todas o casi todas las células de la planta, pero en general, son muy pocos los virus que invaden los tejidos meristemáticos, lo cual se debe posiblemente a que los meristemos no tienen sistema o tejido vascular formado, y es por este medio por donde los virus se transportan sistemáticamente por toda la planta, también se mueven célula a célula, pero

con menor velocidad, motivo por el cual se presume que las células meristemáticas al estar en continuo crecimiento, no se encuentran invadidas por virus (Conci, 2004, p. 304)

Los meristemos se obtienen de brotes terminales de plantas que han sido mantenidas bajo invernadero, los cuales se esterilizan y lavan con agua destilada estéril generalmente tres veces o más y para la extracción del meristemo propiamente dicho, es necesario la utilización de un estereoscopio y este proceso se debe realizar en cámara de flujo laminar (Mosella y Ascui, 1991, p. 517).

Propagación *in vitro* de cítricos

La propagación *in vitro* de cítricos se ha enfocado principalmente en los órganos reproductivos (núcleos, óvulos y ovarios), obteniéndose plantas libres de virus, también se han realizado estudios sobre el cultivo de segmentos de tallo y raíz como fuente de material vegetal para la microinjertación de ápices caulinares, para la obtención de plantas libres de virus, intención que se fundamenta en los problemas fitosanitarios del cultivo, los cuales generan desde hace varios años la necesidad del desarrollo de investigación en este tema; en Venezuela, por ejemplo, se ha realizado la microinjertación de ápices caulinares de cítricos y se han seleccionado razas débiles del virus de la tristeza de los cítricos; por medio de coordinaciones nacionales de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú, se ha realizado el establecimiento y la conservación de bancos registrados de plantas madre de cítricos libres de virus (PROCIANDINO, 1997, p. 23).

En cuanto a la propagación *in vitro* de cítricos en Colombia, el esquema nacional de certificación de plántulas de cítricos comprende el saneamiento de material vegetal mediante la implementación de técnicas como el cultivo *in vitro*, donde se contemplan la propagación de meristemos y la microinjertación (CORPOICA, Abril de 2006, p. 7).

***Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon)**

El género *Poncirus* posee una sola especie, *P. trifoliata* la cual se caracteriza por ser un árbol pequeño, con abundantes ramas de crecimiento acelerado, posee espinas simples y

hojas trifoliadas; probablemente es la especie más estable de todos los cítricos, esto debido a que los híbridos obtenidos a partir de su cruce con otros cítricos, generalmente son estériles, lo que ha preservado sus características durante siglos. La importancia de esta especie y su uso como portainjerto radica en su vigor, rusticidad y en especial a la tolerancia que presenta a algunas enfermedades (Agustí y Almela, 1991, p. 20).

Poncirus trifoliata var. *monstruosa* comúnmente conocido como Flying Dragon, es un patrón de porte enano, es decir, la copa mide menos de 1,80 metros, esta característica genera que el patrón, tienda a adelantar el comienzo del periodo de fructificación y la época de maduración del fruto; Flyng Dragon es tolerante a: Phytophthora, el virus de la tristeza CTV (Citrus tristeza virus), psorosis CPsV (Citrus psorosis virus) y a Xyloporosis (Citrus xyloporosis virus); es resistente al frío y tolerante a nematodos. Con este patronaje se consigue una calidad de fruto mejorada, características que lo convierten en uno de los patrones de cítricos, más utilizados en Colombia (CORPOICA, Julio 2006, p. 10).

MATERIALES Y METODOS

Localización

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Institución Educativa Distrital Francisco de Miranda¹, ubicado en la ciudad de Bogotá en el barrio Timiza, el cual cuenta con el espacio y los equipos necesarios para el desarrollo de cultivo de tejidos *in vitro*.

Durante la investigación se estableció en cultivo *in vitro*, semillas y meristemas axilares de *Poncirus trifoliata var. monstrosa*, comúnmente conocido como Flying Dragon, y se evaluaron diferentes tratamientos, los cuales consistieron en los medios de cultivo con y sin hormona y un sustituto de esta de bajo costo.

Con el fin de identificar el medio óptimo para la propagación de cada tipo de material vegetal se utilizó un diseño estadístico de bloques al azar y 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 meristemas, para evaluar el porcentaje de explantes con proliferación de brotes.

Para la propagación *in vitro* se elaboraron los medios de cultivo a evaluar, se realizó la consecución del material vegetal óptimo, se estableció un protocolo de desinfección para cada tipo de material vegetal y posteriormente este se propagó. Paralelo a la propagación de las semillas *in vitro*, con el fin de evaluar el comportamiento y la germinación de las semillas en campo, se realizaron siembras *ex vitro* en vivero.

Elaboración de medios de cultivo

Los medios de cultivo evaluados, se realizaron con base a lo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (tabla 1.), para lo cual se elaboraron las soluciones madre o soluciones stock, las cuales se guardaban en refrigeración y al momento de la elaboración de los

¹ I. E. D. Francisco de Miranda - Bogotá D.C. Colombia. Diag. 41 Sur #72 A 34

medios, se extraía la cantidad deseada, de cada una de ellas, con la ayuda de una pipeta estéril, diferente para cada solución (Imagen 1.).

Tabla 1. Composición de soluciones Stocks del medio de cultivo Murashige y Skoog.

Solución	Sales	Concentración del stock en g/L	Concentración final en el medio mg/L	Cantidad de stock para un litro de medio
A	NH_4NO_3	82.5	1650	20ml
B	KNO_3	95.0	1900	20ml
C	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	88.0	440	5ml
D	KH_2PO_4	34.0	170	5ml
E	H_3BO_3	1.24	6.2	5ml
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.25	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.025	
	KI	0.166	0.83	
F	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	74.0	370.0	5ml
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.45	22.3	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.72	8.6	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.025	
G	Na_2EDTA	7.46	37.3	5ml
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.57	27.8	



Imagen 1. Soluciones Stock para la elaboración de los medios de cultivo (Lozano, 2015).

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, las cuales fueron pesadas, preparadas y adicionadas utilizando una micropipeta, según el caso (Imagen 2.).



Imagen 2. A. Balanza analítica para realizar el pesaje los reactivos, B. Micropipeta y C. Agar utilizados para la elaboración de los medios de cultivo (Lozano, 2015).

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



Imagen 3. Extracción de agua de coco para la elaboración de los medios de cultivo (Lozano, 2015).

Como alternativa de bajo costo en remplazo de las hormonas, se utilizó agua de coco, la cual se extrajo en laboratorio (Imagen 3.) y específicamente para la hormona (GA3) se utilizó extracto de residuos agrícolas de cebolla larga, puesto que en estudios hechos por Díaz et al. (Julio de 2013), se evidencio en este un alto contenido de ácido giberélico. La metodología para la elaboración del extracto, correspondió con la metodología propuesta en esta investigación.

Igualmente la concentración del extracto utilizada se fundamentó en los resultados obtenidos por Díaz, donde se encontró que la cantidad de ácido giberélico corresponde al 2,70% de cebolla seca.

Después de adicionar las soluciones stock, el agar, la sacarosa, el inositol, las hormonas y demás, 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 (Imagen 4.); posteriormente se sirvieron en recipientes de vidrio, se taparon y se llevaron a la autoclave a 15psi durante 20 minutos para su esterilización (Imagen 5.).

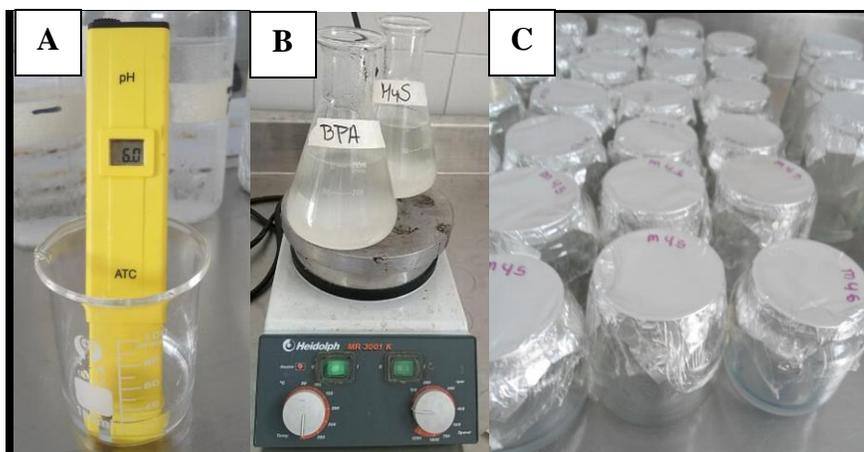


Imagen 4. Elaboración de los medios de cultivo. **A** toma de pH, **B** plancha de calentamiento y agitación para la homogenización de los medio y **C** su posterior envase en frascos de vidrio, antes de autoclavarlos (Lozano, 2015).

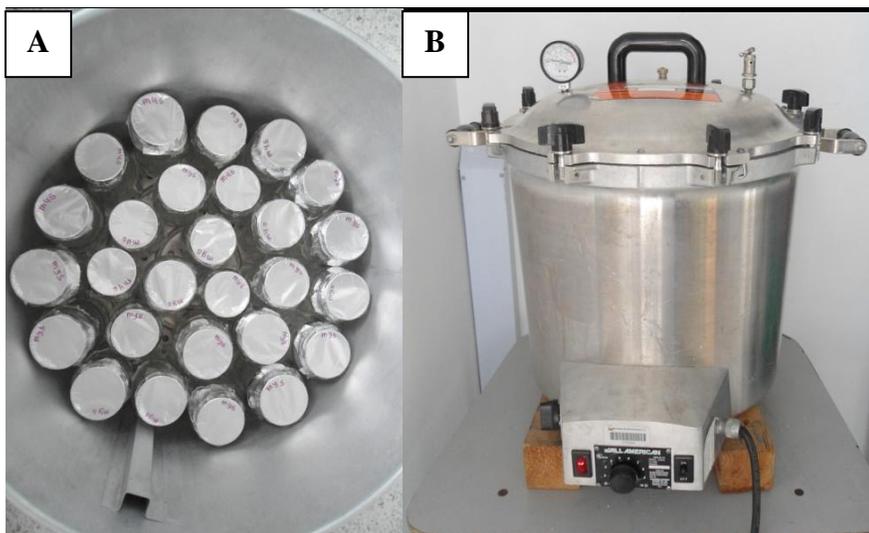


Imagen 5. **A** y **B.** Autoclave para la esterilización de los medios de cultivo y los demás implementos utilizados en la siembra (Lozano, 2015).

Recolección del material vegetal

Las semillas y las yemas utilizadas para la extracción de meristemos provienen del vivero “Frutales del Trópico” (Imagen 6.) 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, donde se encuentran registrados los viveros de todo el país.



Imagen 6. “Vivero Frutales del Trópico” (Lozano, 2016)

Semillas

Se recolectaron frutos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) para la extracción de semillas, de plantas madre, como se puede observar en la Imagen 7., ubicadas en huerto básico del vivero.

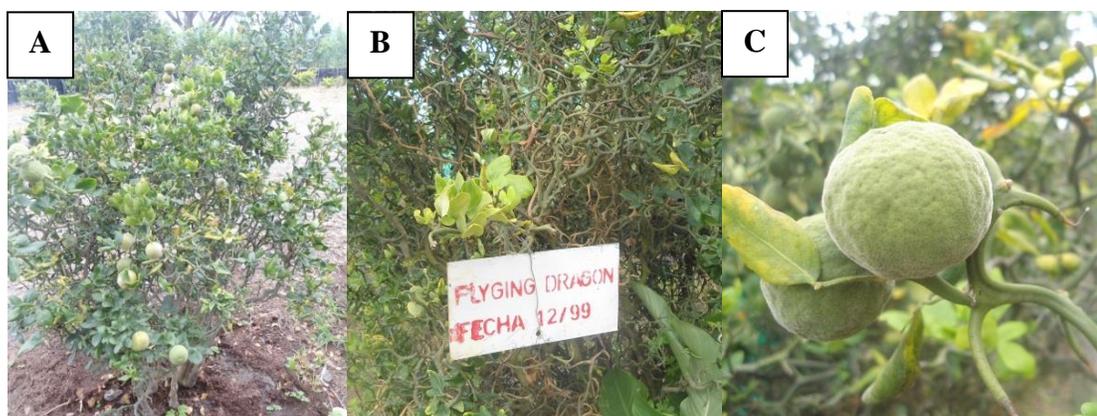


Imagen 7. A – B Plantas madre y C frutos para la obtención de semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2015).

Meristemos

Para la extracción de meristemos, como se evidencia en la Imagen 8., se tomaron plántulas entre los 4 a 6 meses de edad, las cuales se encontraban bajo casa malla en el vivero.

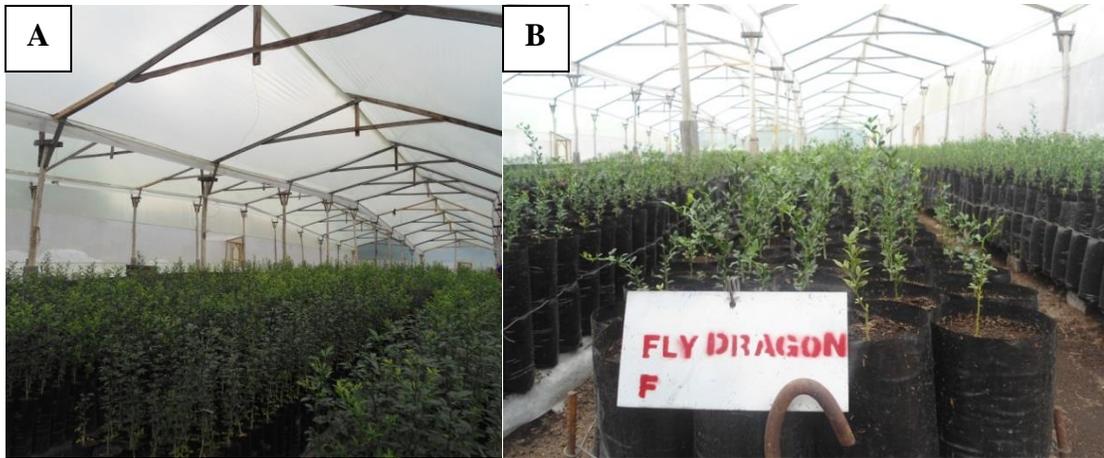


Imagen 8. A Casa malla y B plántulas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2015).

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.

Semillas

Los frutos de Flying Dragon son lavados con agua y jabón en polvo; posteriormente se abren con un bisturí estéril y se extraen las semillas (Imagen 9.).

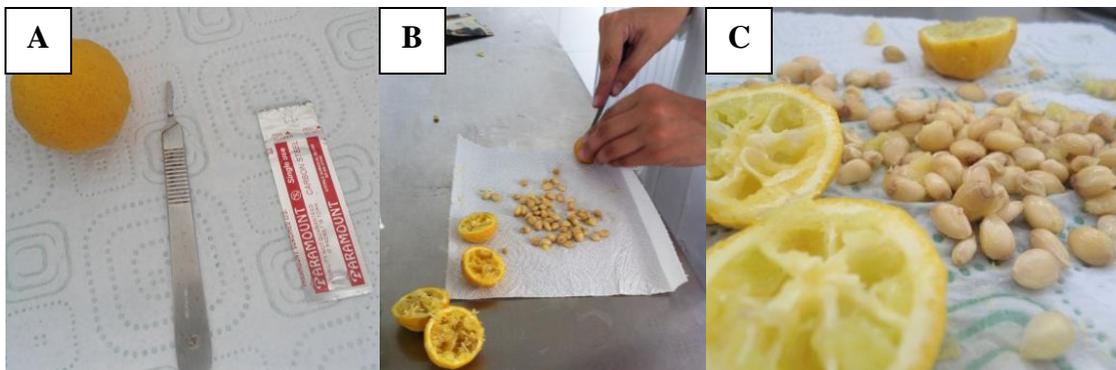


Imagen 9. A Elementos necesarios B – C y procedimiento para la extracción de semillas de Flying Dragon (Lozano, 2015).

Las semillas se depositaron en un frasco de vidrio estéril y llevadas 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 juagando 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 juagadas tres veces, con agua destilada estéril (Imagen 10.).



Imagen 10. A, B, C y D Procedimiento para la desinfección de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2015).

Meristemos

Como se evidencia en la Imagen 11., una vez ingresadas las plántulas al laboratorio, para la extracción de meristemos se toman las yemas eliminando las hojas, utilizando un bisturí estéril; posteriormente estas son depositadas en un frasco de vidrio.



Imagen 11. A Plántula y B – C proceso de extracción de yemas de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (Flying Dragon) para realizar el protocolo de desinfección (Lozano, 2015).

Una vez extraídas, las yemas son lavadas con agua y jabón en polvo, agitando por cinco minutos y juagando, posteriormente se depositan en un frasco de vidrio estéril y 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 juagando tres veces con agua destilada estéril (Imagen 12.).



Imagen 12. A y B Desinfección de yemas para la extracción de meristemas (Lozano, 2015).

Propagación del material vegetal

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 (Imagen 13.); posterior a la siembra se incubaron a 30°C.

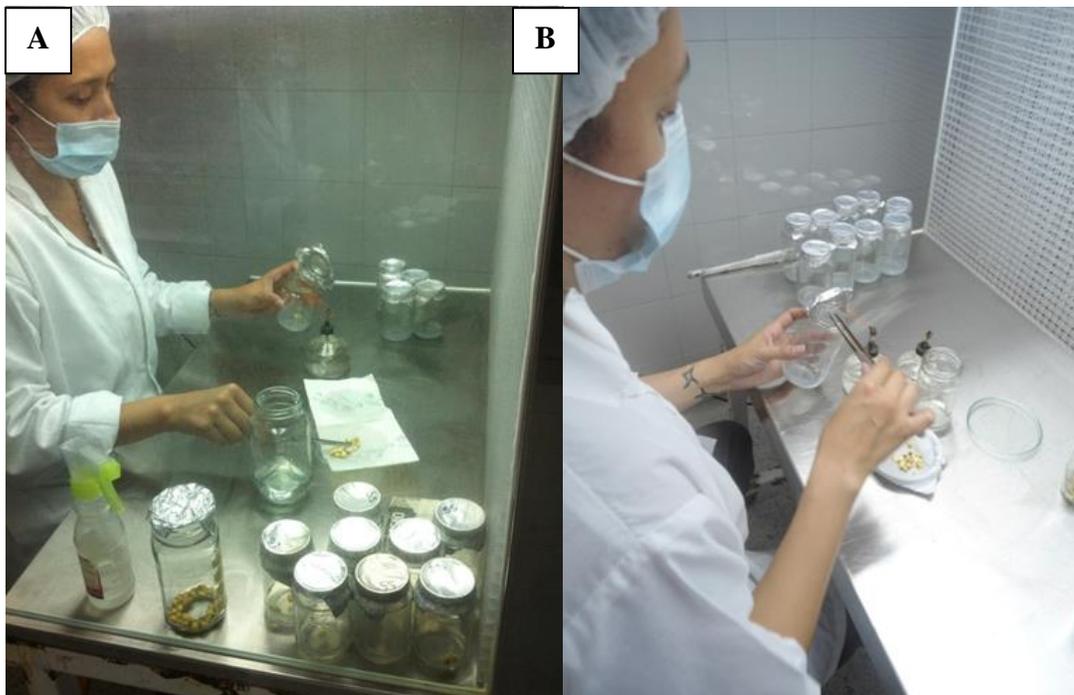


Imagen 13. A y B Siembra de semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en los medios de cultivo, proceso realizado en cabina de flujo laminar (Lozano, 2015).

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 (Imagen 14.), para un total de 30 semillas por repetición y 90 semillas por tratamiento.

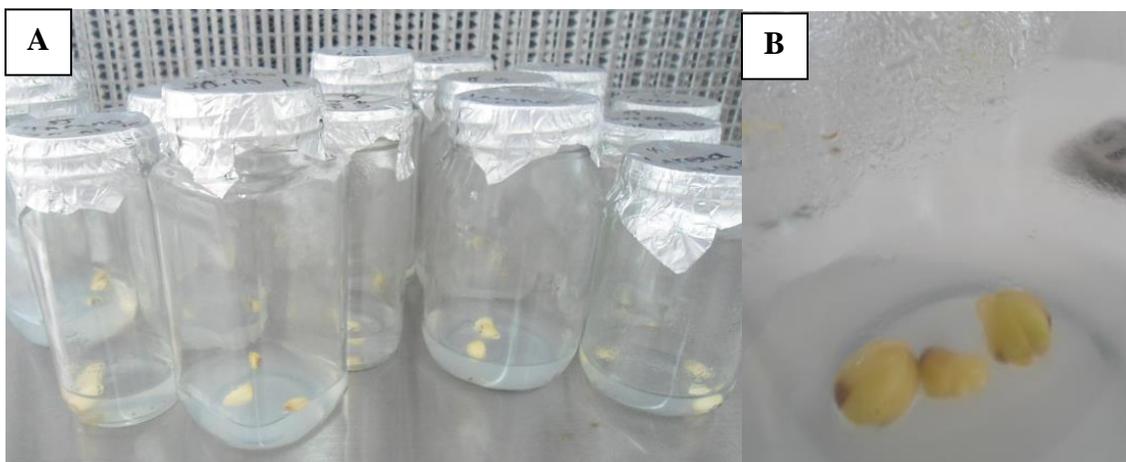


Imagen 14. A y B Semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en cultivo *in vitro* (Lozano, 2015).

Meristemos

Posterior a la desinfección, como se observa en la Imagen 15., se tomó cada yema y se realizaron diferentes cortes con ayuda de un estereoscopio para realizar la extracción de cada meristemo (Imagen 16.). 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.

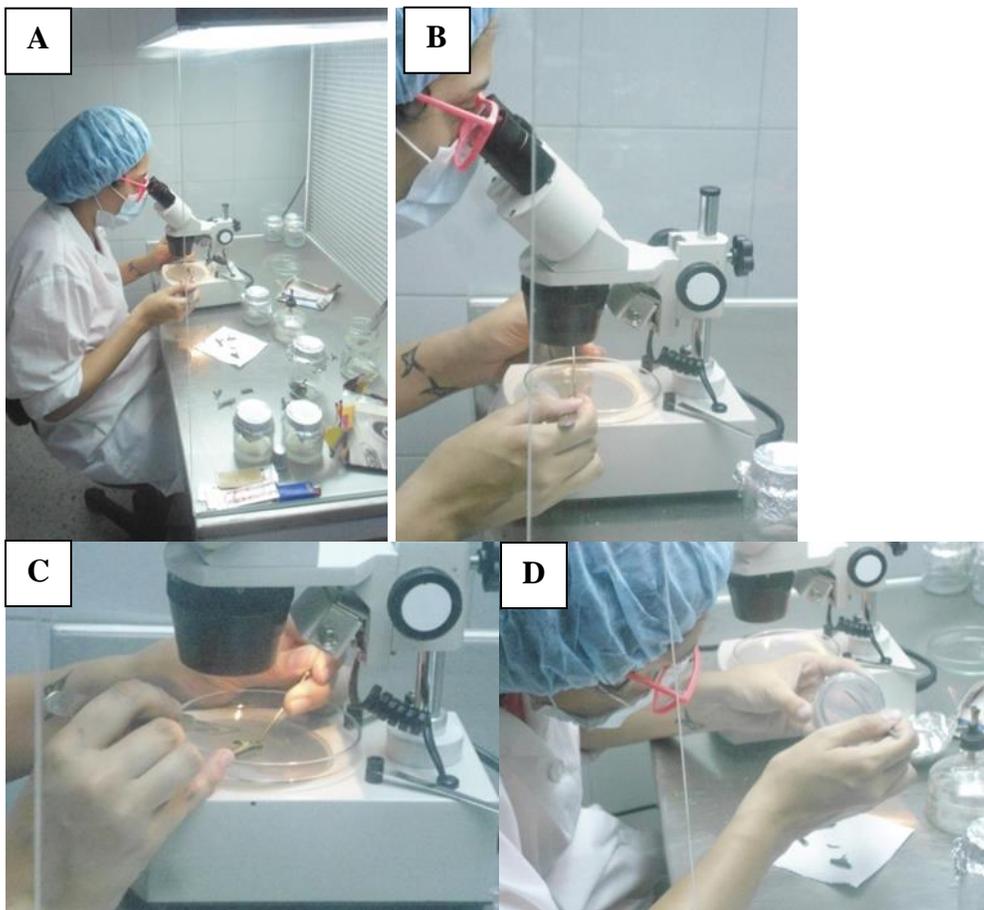


Imagen 15. A, B, C Extracción de meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* y D su siembra en los medios de cultivo (Lozano, 2015).



Imágenes 16. A, B, C, Proceso de extracción y D – G meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Vista Estereoscopio) (Lozano, 2015).

Siembra en vivero

Para la siembra en condiciones *ex vitro*, se tomaron semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Imagen 17.) para ser sembradas en campo. Las semillas se lavaron y cubrieron con Vitabax para evitar su contaminación; se sembraron 6 repeticiones las cuales constaban de 100 semillas, el sustrato utilizado consistió en una mezcla de escorea y tierra (Imagen 18.); la siembra se realizó en el vivero “Frutales del Trópico” bajo casa malla; semana a semana, se registró la velocidad y el porcentaje de germinación y la temperatura del sustrato (Imagen 19.).



Imagen 17. A – B Recolección y C extracción de semillas para la siembra en el vivero.

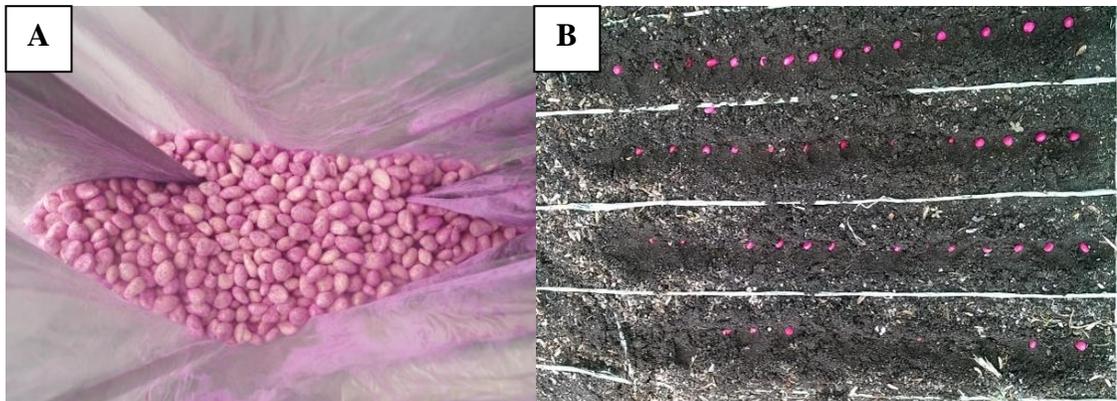


Imagen 18. **A** Semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) con fungicida y **B** su siembra en condiciones *ex vitro*.

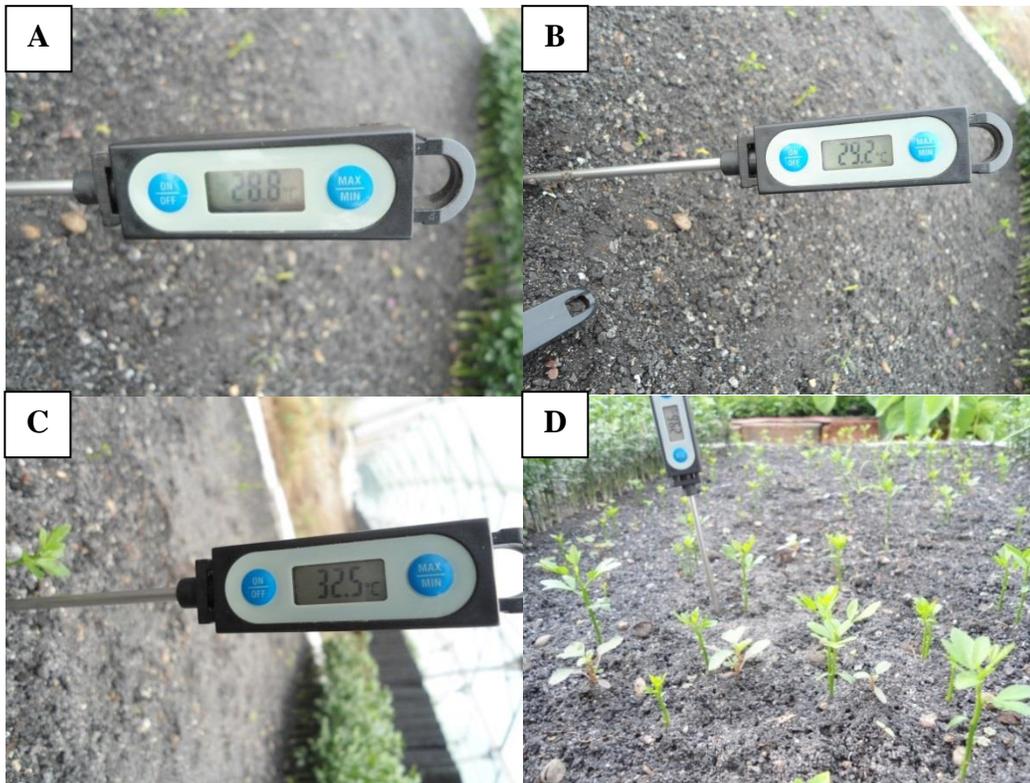


Imagen 19. **A, B, C y D.** Temperatura en el sustrato empleado para la germinación en campo de Flying Dragon

Diseño experimental

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 DISCUSION

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 anteriormente 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.

Para la evaluación del protocolo propuesto, se realizó seguimiento semanal a la proliferación de agentes contaminantes como bacterias u hongos en cada frasco sembrado, hasta un mes después de la siembra para los meristemos y dos meses para las semillas; el protocolo usado para la desinfección del material vegetal resulto efectivo, pues se presentó un porcentaje de contaminación del 5% para las semillas y del 1% para los meristemos de Flying Dragon.

La contaminación se presentó, producto del estado del ambiente, principalmente al momento de la elaboración de los medios de cultivo (anexo 3.); 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).

Martinez 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*.

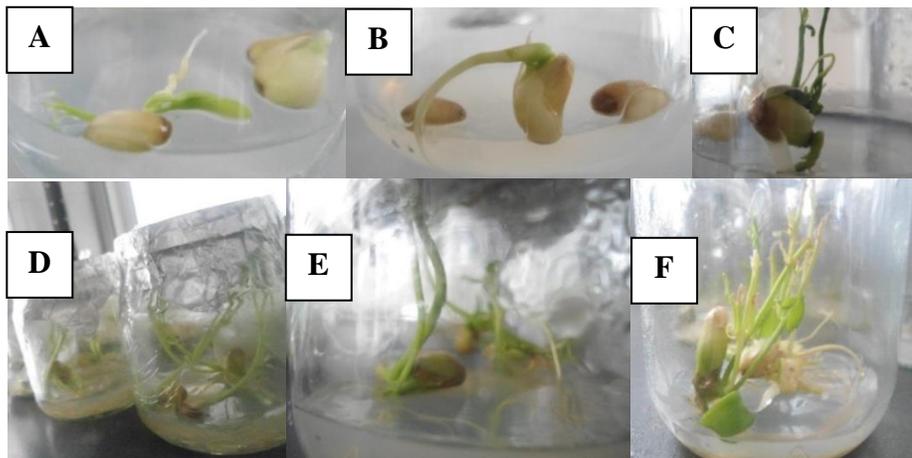


Imagen 20. A, B, C, D, E y F Germinación de semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en cultivo *in vitro* (Lozano, 2016).

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de germinación de Flying Dragon (Imagen 20.) en cada uno de los medios de cultivo durante el tiempo de evaluación se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de germinación de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en cultivo *in vitro* durante el tiempo de evaluación (Lozano, 2016).

Rep	Medios de Cultivo (Tratamiento)	% Germinación 15 dds	% Germinación 30 dds	% Germinación 60 dds
1	Sin Hormona	14,3	33,3	36,6
2	Sin Hormona	10	27,1	36,6
3	Sin Hormona	12,5	29,2	37,5
1	0,1mg/L GA3	16,7	16,6	50
2	0,1mg/L GA3	8,3	8,3	25
3	0,1mg/L GA3	0	8,3	8,3
1	0,01mg/L GA3	10	30	33,3
2	0,01mg/L GA3	13,3	36,6	36,6
3	0,01mg/L GA3	13,3	33,3	33,3
1	3,7mg/L Extr. Cebolla	0	30	30
2	3,7mg/L Extr. Cebolla	6,6	26,6	30
3	3,7mg/L Extr. Cebolla	0	26,6	26,6
1	0,37mg/L Extr. Cebolla	13,3	30	43,3
2	0,37mg/L Extr. Cebolla	20	30	40
3	0,37mg/L Extr. Cebolla	13,3	23,3	36,6
1	100ml/L Agua de Coco	15,6	33,3	77,8
2	100ml/L Agua de Coco	6,7	20	33,3
3	100ml/L Agua de Coco	6,7	26,7	60

Análisis estadístico.

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 ²	R ² 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 R² 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% (Anexo 2.), 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 $F_c < F_t$ ($0,02 < 5,143$), 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 germinación de semillas de Flying Dragon en cultivo *in vitro*.

De acuerdo al Test de Tukey y como se evidencia en la Gráfica 3, 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.

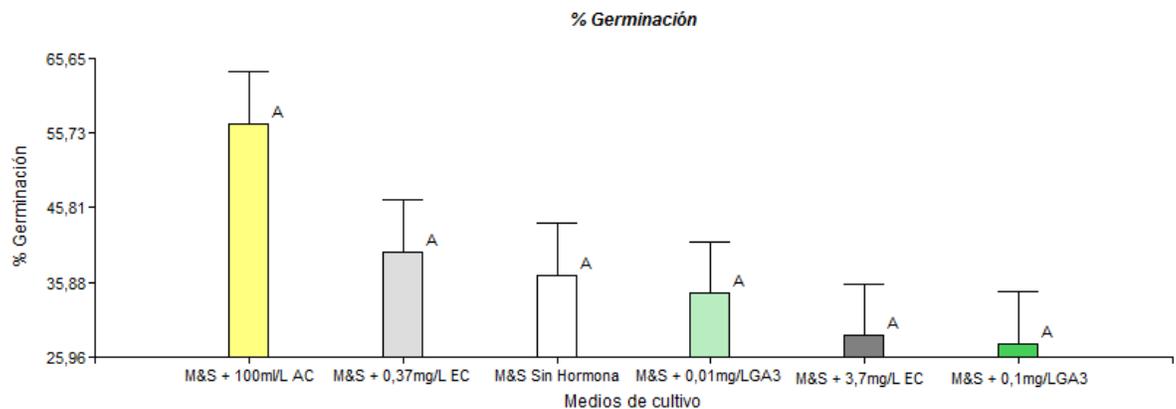
Otro ejemplo del empleo de agua de coco, para la germinación de semillas, es la investigación realizada por Salazar, et al. (2013), donde obtuvieron un porcentaje en la

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

Germinación de semillas en campo

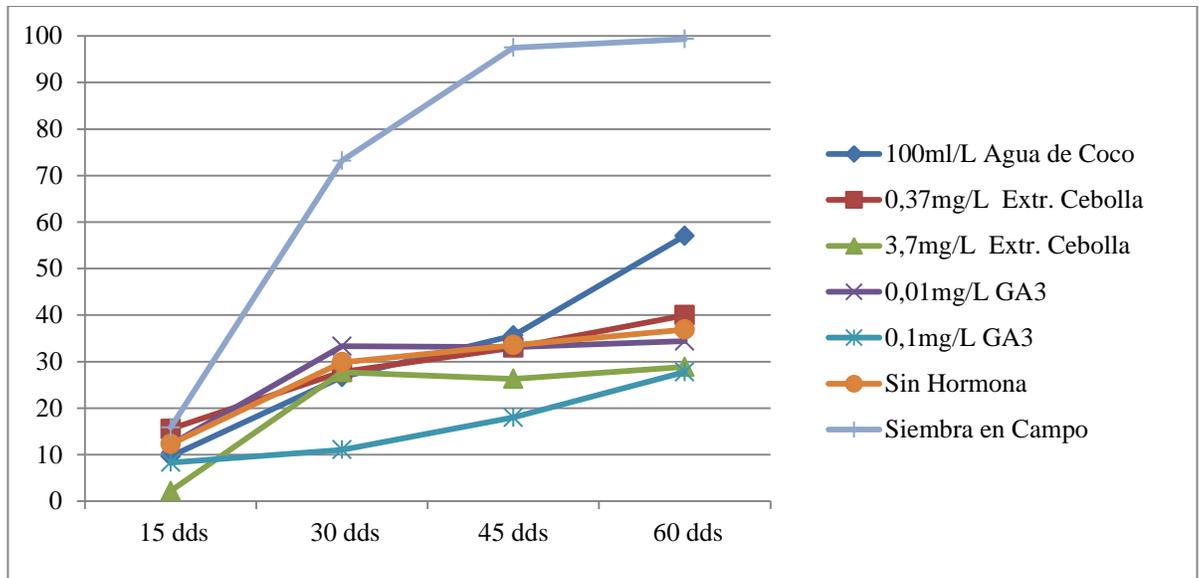
Con el fin de tener un referente para comparar la germinación de las semillas de Flying Dragon, determinando la velocidad y el porcentaje de germinación de las semillas en campo, se realizaron siembras en camas de germinación bajo casa malla, ya que como se mencionó anteriormente (p. 18) la información existente respecto a este cultivar es escasa; con base a lo anterior se obtuvieron los resultados que se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en campo, durante el tiempo de evaluación (Lozano, 2016).

% Germinación								
Repetición	7dds	15dds	22dds	30dds	37dds	45dds	52dds	60dds
1	0	10	33	69	84	99	99	99
2	0	15	29	65	93	93	93	93
3	0	17	42	71	97	97	97	97
4	0	15	73	84	97	99	99	99
5	0	18	36	69	85	100	100	100
6	3	20	56	81	97	97	97	97

Como se evidencia en la gráfica 4, a diferencia de la propagación por cultivo *in vitro*, al sembrar en campo (bajo casa malla), el mayor porcentaje y la velocidad de germinación se obtuvo a los 37 y 45 días después de la siembra.

El promedio del porcentaje de germinación fue del 97,5 % a los 45 dds, que como se puede observar, fue superior a los porcentajes de germinación obtenidos con los tratamientos implementados en cultivo *in vitro*.



Gráfica 4. Velocidad y porcentaje de germinación de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2016).

Tanto los resultados obtenidos en campo, como los obtenidos en cultivo *in vitro*, contrastan con los resultados obtenidos por Rodrigues et al. (2010) donde se aplican dos tipos de tratamientos para la germinación de semillas de Flying Dragon en campo; los tratamientos empleados consistieron en la remoción del tegumento de la semilla y el sumergirlas en GA3, antes de su siembra; obtuvieron un porcentaje máximo de germinación a los 60 días después de la siembra; con el tratamiento de inmersión en GA3, obtuvieron un porcentaje de germinación máximo del 22,5% aprox. y con la remoción del tegumento de la semilla del 18% aprox.

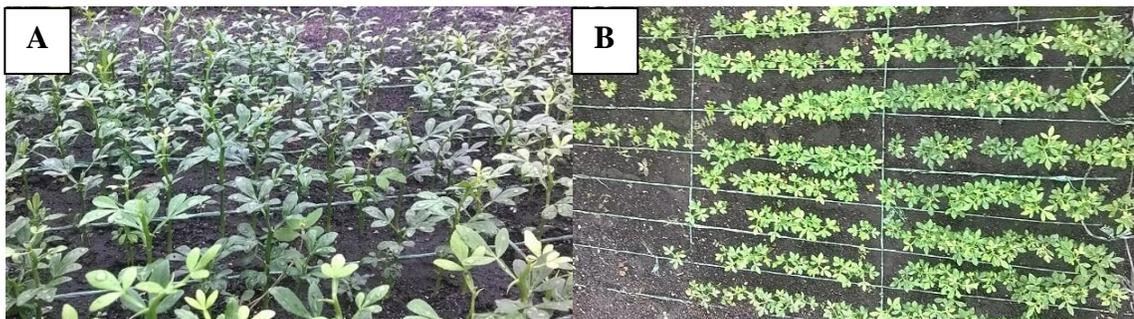


Imagen 21. A y B Germinación de semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en campo (Lozano, 2016).

La razón por la cual en la presente investigación se obtuvo un porcentaje de germinación superior al de Rodrigues et al. (2010) tanto en campo (Imagen 21.) como en cultivo *in*

vitro, puede deberse a la temperatura, pues la proporcionada en cultivo *in vitro*, correspondió con la obtenida en campo, la cual de acuerdo al seguimiento realizado, fue de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ aproximadamente y en la investigación mencionada, estas pese a recibir tratamiento térmico de 52°C por 10 minutos, posterior a la siembra, las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente.

Pese a que el porcentaje de germinación obtenido en cultivo *in vitro*, es superior a los resultados obtenidos por Rodrigues et al. (2010), los resultados obtenidos en campo en la presente investigación, son superiores; igualmente, como los tratamientos empleados no presentaron diferencias significativas, es necesario buscar otras alternativas, para aumentar el porcentaje y disminuir el tiempo en la germinación de semillas de Flying Dragon en cultivo *in vitro*.

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

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de proliferación de brotes de los meristemos de Flying Dragon en cada uno de los medios de cultivo durante el tiempo de evaluación son los siguientes:

Tabla 4. Porcentaje de proliferación de brotes en los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) en cada uno de los medios de cultivo propuestos.

Repetición	Medios de Cultivo (Tratamiento)	% Proliferación de Brotes 15 dds	% Proliferación de Brotes 30 dds
1	Sin Hormona	33,3	50
2	Sin Hormona	25	50
3	Sin Hormona	33,3	41,7
1	0,5mg/L BAP	60	100
2	0,5mg/L BAP	46,6	93,3
3	0,5mg/L BAP	60	100
1	0,25mg/L BAP	33,3	58,3
2	0,25mg/L BAP	26,7	75
3	0,25mg/L BAP	33,3	66,7

1	100ml/L Agua de Coco	0	6,7
2	100ml/L Agua de Coco	0	0
3	100ml/L Agua de Coco	0	6,7

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

Análisis estadístico.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² 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<= 0,05)

Según el análisis de varianza aplicado, para niveles de confianza del 95% se obtiene un R² 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% (Anexo 2.), a partir de las

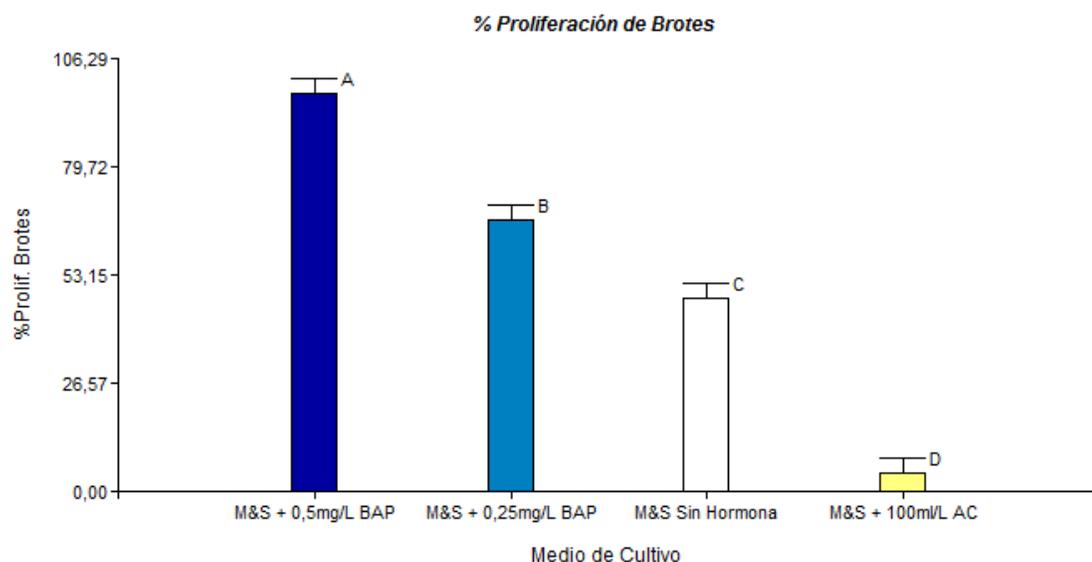
cuales se discutió si se presentó o no diferencia estadística significativa entre los medios de cultivo o entre los bloques.

La “*f calculada*” (F_c) obtenida para los medios de cultivo (tratamientos) fue de 112,75 y la “*f tabulada*” (F_t) 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 corrobora con el test de Tukey.

Por el contrario, la “*f calculada*” (F_c) obtenida para los bloques (repeticiones) fue de 0,02 y la “*f tabulada*” (F_t) 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 5, 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.



Gráfica 5. Porcentaje de proliferación de brotes 30 días después de la siembra de los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2016).

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 μ 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*.

Así mismo el tratamiento que presento 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 sinnfín 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.

Algunos de los meristemos en los que si se presentó proliferación de brotes, se pueden observar en las Imágenes 22. y 23.

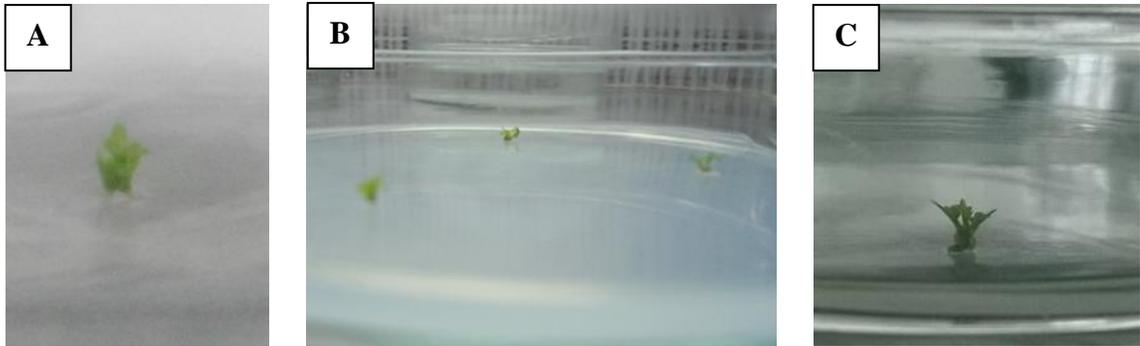


Imagen 22. A, B y C Proliferación de brotes a partir de los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (Flying Dragon) (Lozano, 2016).

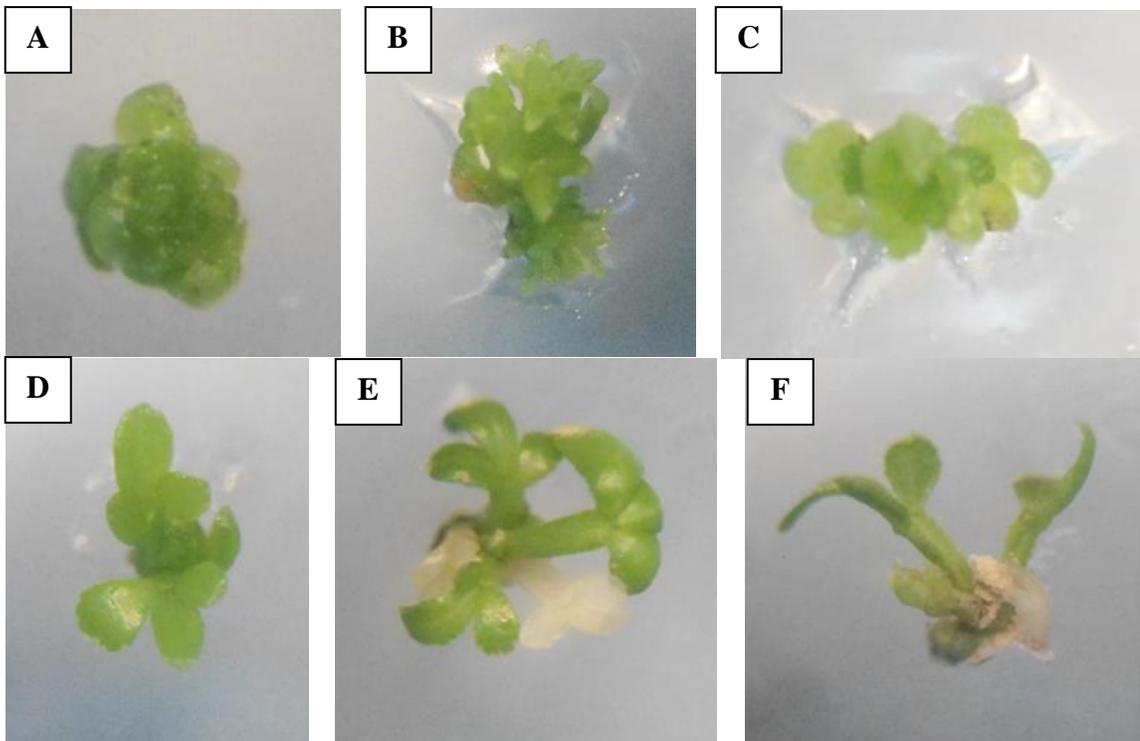


Imagen 23. A, B, C, D, E y F Proliferación de brotes a partir de los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (Flying Dragon) (Vista con Estereoscopio) (Lozano, 2016).

CONCLUSIONES

El protocolo utilizado para la desinfección de semillas y yemas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* fue efectivo, ya que se presentó un porcentaje de contaminación del 5% en las semillas y del 1% para los meristemos, lo cual se considera como aceptable.

No se presentó diferencia estadística significativa entre los medios de cultivo (tratamientos) evaluados para la germinación de semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*, razón por la cual no se pudo determinar cuál de los medios de cultivo (tratamientos) evaluados es el más adecuado.

El mayor porcentaje de germinación *in vitro* de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* se obtuvo en el medio de cultivo Murashige & Skoog suplementado con 100ml/L de agua de coco, con 57,03% de semillas germinadas.

Los resultados obtenidos en la germinación *in vitro*, son inferiores a los obtenidos en la germinación de semillas en campo, evidenciándose la necesidad de evaluar otras alternativas para aumentar el porcentaje y la velocidad de germinación de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* en cultivo *in vitro*.

Al emplear suplementos o fuentes naturales de hormonas, como las utilizadas en la presente investigación en cultivo *in vitro*, es necesario realizar un análisis cualitativo y cuantitativo, en cuanto a sus componentes, para poder comprender la dinámica de los resultados obtenidos con ellas.

El medio de cultivo (tratamiento) más apropiado para la proliferación de brotes a partir de meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* es el medio Murashige & Skoog suplementado con 0,5mg/L de Bencilaminopurina (BAP), ya que con él se obtuvo un porcentaje de 97,7% de brotes proliferados.

El agua de coco usada como suplemento del medio de cultivo para la proliferación de brotes a partir de meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*, presentó un efecto inhibitorio, siendo el tratamiento con el menor porcentaje de brotes proliferados.

RECOMENDACIONES

Evaluar protocolos de desinfección, tanto para semillas, como para yemas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*, disminuyendo la concentración de hipoclorito de sodio y Tween 20 empleados en la solución de inmersión del material vegetal, para así determinar si con menores concentraciones de estos dos compuestos, se pueden obtener resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Implementar diferentes técnicas como la eliminación de la testa de la semilla, el uso de otras concentraciones de hormona y diferentes rangos de temperatura, entre otros, para aumentar el porcentaje y la velocidad de germinación *in vitro* de las semillas de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*.

Evaluar el número de brotes proliferados a partir de meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* y no solo el porcentaje de proliferación.

Evaluar protocolos en el medio de cultivo, para el enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos a partir de los meristemos de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa*, los cuales se pueden realizar evaluando diferentes concentraciones de una auxina que promueva el desarrollo de raíces como el ácido indolbutírico.

ANEXOS

Anexo 1. Cotización semilla de *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* (Flying Dragon).


NIT. 1.069.744.988-6

Fusagasuga, 20 de Noviembre de 2015

Señores
LORENA LOZANO
La Ciudad

Ref. Cotización Semilla Fly Dragón

Cordial saludo,

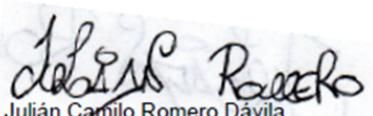
Por medio de la presente me permito poner a su disposición costo de la semilla de Flying Dragon

Nº	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	VALOR
1.	1	Kilogramo	\$ 1.000.000

FORMA DE PAGO. Contra entrega
VALOR DE LA OFERTA: 30 días

Quedo atento a cualquier duda e inquietud

Cordialmente


Julián Camilo Romero Dávila
Nit 1.069.744.988-6

Km 62.9 Chinauta Vía Melgar TOLIMA
321 429 2576-311 262 3729
Email: viverofrutalesdeltropico@hotmail.com

Anexo 2. Valores F de la distribución F de Fisher para 95% de confianza

Tabla 5. VALORES F DE LA DISTRIBUCIÓN F DE FISHER

$1 - \alpha = 0.95$ v_1 = grados de libertad del numerador
 $1 - \alpha = P (F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$ v_2 = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	242.981	243.905	244.690	245.363	245.949	246.466	246.917	247.324	247.688	248.016
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.433	19.437	19.440	19.443	19.446
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.692	8.683	8.675	8.667	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.844	5.832	5.821	5.811	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.604	4.590	4.579	4.568	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.922	3.908	3.896	3.884	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.494	3.480	3.467	3.455	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.202	3.187	3.173	3.161	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.989	2.974	2.960	2.948	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.828	2.812	2.798	2.785	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.701	2.685	2.671	2.658	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.599	2.583	2.568	2.555	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.515	2.499	2.484	2.471	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.479	2.458	2.440	2.424	2.409	2.396	2.384
15	4.543	3.682	3.287	3.055	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.385	2.368	2.353	2.340	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.333	2.317	2.302	2.288	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.289	2.272	2.257	2.243	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.250	2.233	2.217	2.203	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.215	2.198	2.182	2.168	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.184	2.167	2.151	2.137	2.124
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.156	2.139	2.123	2.109	2.096
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.131	2.114	2.098	2.084	2.071
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.109	2.091	2.075	2.061	2.048
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.620	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.088	2.070	2.054	2.040	2.027
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.069	2.051	2.035	2.021	2.007
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	2.052	2.034	2.018	2.003	1.990
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	2.036	2.018	2.002	1.987	1.974
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	2.021	2.003	1.987	1.972	1.959
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	2.007	1.989	1.973	1.958	1.945
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.995	1.976	1.960	1.945	1.932

Anexo 3. Contaminación en los medios de cultivo.



BIBLIOGRAFIA

Abdelnour, A. y Escalant, J., (1994), Catie, Costa Rica, *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*, IICA.

Agronet. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Área, Producción y Rendimiento. Producción de cítricos en Colombia 2000 – 2013. Recuperado de: <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>

Aguilar, P., Escobar, M. y Pássaro, C., (Agosto de 2012). Situación actual de la cadena de cítricos en Colombia: Limitantes y perspectivas. En Garcés, F. (Ed.), *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización* (pp. 7 – 48). Caldas, Colombia, Corporación Universitaria Lasallista.

Agustí, M. y Almela, V., (1991), Barcelona, España, *Aplicación de fitorreguladores en citricultura*, AEDOS.

Agustí, M., (2012), *CITRICULTURA*. Madrid, España, Ediciones Mundi-Prensa.

Bertolini, V., Damon, A., y Rojas A. (2014). Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). Universidad Nacional de Colombia. bdigital portal de revistas UN. Revisado en: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/42735/48393

Caicedo, A. y Gómez, J., (Junio de 2006), *La limpieza fitosanitaria de plántulas de cítricos y el programa nacional de certificación de material de propagación*. Palmira, Colombia, CORPOICA, Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural.

Caicedo, A. y Muñoz, O., (Agosto de 2006), Limpieza fitosanitaria de enfermedades virales en plántulas de cítricos, Palmira, Colombia, CORPOICA, Boletín Divulgativo N° 26.

Conci, V. (2004). Parte VIII. Capítulo 5. Obtención de plantas libres de virus. En Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Ed.), *Biotecnología y mejoramiento vegetal* (pp. 303 – 312), Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

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.

CORPOICA. (Ed). (Julio de 2006). *Patrones para la producción de cítricos en Colombia*, Palmira, Colombia, CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

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.

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.

DANE. (Ed.). (Abril de 2016). 3^{er} 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>

Díaz, L., Henao, A., Ramírez, L., (Julio de 2013), Residuo agrícola de cebolla larga como fuente de ácido giberélico, Chía, Cundinamarca, Universidad de la Sabana.

FAO. (Ed.). (Marzo de 2000), *Políticas y programas de semillas en América Latina y el Caribe*, Merida, Mexico, FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, estudio FAO producción y protección vegetal 164.

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

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>

IICA. (Ed.). (Abril de 1987). *Memoria II Curso de cultivo de tejidos*. Turrialba, Costa Rica. IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

IICA. (Ed.). (1994). *Seminario internacional sobre biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales, 26 al 30 de Septiembre de 1994*, Maracay, Venezuela, IICA.

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.

Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Squeo, F. y Cardemil, L. (Ed), *Fisiología Vegetal (15)*, La Serena, Chile, Ediciones Universidad de La Serena.

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.

Litz, R. y Jarret, R., (Mayo de 1991). Capítulo 7. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 144 – 171), Cali, Colombia, CIAT.

Martínez, H., Peña, Y. y Espinal, C., (Marzo de 2005), *La cadena de cítricos en Colombia. Una mirada de su estructura y dinámica 1991 – 2005*, Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas.

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).

Morin, C. 1965. *Cultivo de Cítricos*. Lima, Perú, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Editorial IICA.

Mosella, L. y Ascuí, L. (Mayo de 1991). Capítulo 23. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones (pp. 513 – 532), Cali, Colombia, CIAT.

Müller, E., (1964), Turrialba, Costa Rica, *Manual de laboratorio de fisiología vegetal*, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas O.E.A. IICA.

Murashige, T. y Skoog, F., (Julio de 1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. (15).

Oliveira, R., Dos Santos, W., Sampaio, O., Bueno, W. y Gomes, P. (2008). *Porta-enxertos para Cítricos*. Brasil. Embrapa. Revisado en: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744475/1/documento226.pdf>

Ordúz, J. y Mateus, D. (Agosto de 2012). Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. En Garcés, F. (Ed.), Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización (pp. 49 - 88). Caldas, Colombia, Corporación Universitaria Lasallista.

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.

Peña, P. (Ed). (Sin fecha). *Cultivo de cítricos*, Santo Domingo, República Dominicana, Fundación de Desarrollo Agropecuario FDA Centro Para en Desarrollo Agropecuario y Forestal, INC. Boletín Técnico N° 10. Revisado en: <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/download/citricos.pdf>

Peña, I., Pérez, M., Batista, L., Velázquez, K. y Alonso, M., (2004), *Principales enfermedades virales y afines de los cítricos*, Cuba, Fondo fiduciario Pérez Guerrero Editor, Acta del Curso Taller sobre producción de material de propagación certificado de cítricos.

Pérez, J. (Mayo de 1991). Capítulo 25. Cultivo de tejidos en la caña en azúcar. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 543 – 576). Cali, Colombia, CIAT.

PROCIANDINO. (Ed.). (1997). *Proyecto consolidación de la red andina de investigación y transferencia de tecnología en frutihorticultura de exportación*, Venezuela, Fruthex. Informe final, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. IICA.

Ramírez, J., Ordoñez, P., Narváez, E., Pinzón, S., Martínez, M., Murcia, N. y Salazar, S., (2004), *Principales características y tendencias del mercado de cítricos en Colombia*, Palmira, Colombia, CORPOICA.

Roca, W. (Noviembre 1980), *El cultivo de meristemas de yuca*, Cali, Colombia, CIAT.

Roca, W. y Mroginski, L. (Mayo de 1991), Capítulo 2, Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 144 – 171), Cali, Colombia, CIAT.

Rodrigues, F., Freitas, D., Moreira, R. y Pasqual, M. (Diciembre de 2010). Caracterização dos frutos e germinação de sementes dos porta-enxertos trifoliata Flying Dragon e Citrumelo Swingle. *Revista Brasileira Frutícola, Jaboticabal*, (32), pp. 1180 – 1188.

Rojas, P. (Junio de 2001). *Establecimiento de una metodología para la micripropagación de patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC)*. (Tesis de maestría). Universidad veracruzana. Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias. Veracruz, México.

Rojas, S., García, J. y Alarcón, M., (2004), *Propagación Asexual de Plantas*, Colombia, CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Roldan, D. y Salazar, M., (Mayo de 2002), *La cadena de cítricos en Colombia*, Bogotá, Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas Colombia.

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.

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.

Van Le, B., Thanh, N., Anh, L. y Trân 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.

Vasquez, H. (2013). EVALUACIÓN DE *Poncirus trifoliata* var. *monstruosa* Flying Dragon COMO PORTAINJERTO ENANIZANTE PARA NARANJA Y MANDARINA COMPARADO CON OTROS PATRONES. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.

Villalobos, V. y Thorpe, A. (Mayo de 1991). Capítulo 6. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 127 – 142), Cali, Colombia, CIAT.