

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

TÍTULO:

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LIMONCILLO (*Swinglea glutinosa*)

POR

DAYAN A. PALACIO R.

4-781-256

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2019

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN*
VITRO DE LIMONCILLO (*Swinglea glutinosa*)

TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA EN CULTIVOS TROPICALES

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

APROBADO:

DIRECTOR: M.Sc. SIMÓN VÁSQUEZ.

MIEMBROS: POFESOR RICARDO BLAS

MIEMBROS: PhD. JUAN M. OSORIO

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2019

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradecer a Dios Padre Todopoderoso, por haberme permitido llegar hasta aquí, por no abandonarme en los momentos cuando más lo necesité. Por levantarme cuando creí que ya no podía continuar.

A mis padres, Lic. Martin Palacio y Mtr Diana Rodríguez, por todo su amor, esfuerzo, paciencia y dedicación para que yo llegara hasta aquí, por ser unos excelentes padres, por haber sido siempre una inspiración para mí y porque siempre han creído en mí.

A mis hermanos Pedro Palacio y Arianis Palacio que han sido parte importante para que yo llegara hasta aquí, en las buenas y en las malas siempre conté con ellos.

A el Profesor asesor M.Sc. Simón Vásquez, por haberme brindado su apoyo, su conocimiento, su asesoría durante todo el desarrollo de mi investigación y haberme abierto las puertas del laboratorio y permitirme hacer mi trabajo de investigación en el área por la cual ingresé a la carrera.

A la profesora Lic. Rosemary Serrano, porque desde el día uno estuvo con la mejor disposición de ayudarme y brindarme sus conocimientos en el laboratorio hasta convertirse en más que una profesora, una compañera de laboratorio.

Al Dr. José Ramón Binns, por brindarme su apoyo en el análisis estadístico.

A aquellos compañeros que durante el camino se convirtieron en amigos, con quienes pasé por tantos momentos y que en cada momento estuvieron para apoyarme y dame ánimos de seguir adelante. Y a todas esas personas que siempre estuvieron para brindarme su ayuda y consejos.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi Dios y a mis Padres, porque fueron mi fuente de inspiración y mi fuerza.

A mis compañeros y amigos que me acompañaron durante toda esta etapa.

A todos mis profesores por su conocimiento brindado a lo largo de toda la carrera.

DAYAN A. PALACIO

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LIMONCILLO (*Swinglea glutinosa*)

Palacio Dayan, 2019. Desarrollo de una metodología para el establecimiento *in vitro* de Limoncillo (*Swinglea glutinosa*). Tesis Ingeniería agronómica en cultivos tropicales. FCA. UP

RESUMEN

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, durante los meses de octubre del 2018 y junio de 2019. El objetivo fue el de evaluar la respuesta de *Swinglea glutinosa* (limoncillo) a la micropropagación, a través de ápices y yemas axilares provenientes de la germinación *in Vitro* de semillas gámicas y su respuesta ante la presencia de reguladores de crecimiento (Ácido giberélico, Bencilaminopurina y Ácido Indolbutírico). Estas semillas para su desinfección fueron sumergidas en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) a una concentración de 1.25% durante distintos tiempos de inmersión (15 y 30 minutos). Se utilizó un diseño completamente al azar. Para las tres etapas se utilizó el medio básico Murashige y Skoog (1962) suplementado con reguladores de crecimiento: Ácido Giberélico (1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l), Bencilaminopurina (1 mg/l, 2 mg/l), Ácido Indolbutírico (0.1 mg/l). El efecto de los tratamientos fue evaluado durante cada una de las etapas del cultivo *in vitro* (Establecimiento y Multiplicación). Los mejores resultados para el efecto desinfectante del Hipoclorito de Sodio (NaClO) se lograron con una inmersión de 30 minutos. El análisis de varianza realizado mediante el sistema computacional SAS: En la etapa de establecimiento el tratamiento que mayor altura de planta alcanzó fue AG 1 ppm con una media de 4.54cm. Se encontraron diferencias altamente significativas en la producción de hojas y brotes con la aplicación de BAP (1, 2) ppm en la etapa de Multiplicación. La mayor tasa de producción de brotes se alcanzó en el primer subcultivo con un Coeficiente de Multiplicación (CM) de 2.63.

Palabras clave: *Swinglea glutinosa*, Ácido Giberélico, Bencilaminopurina, Ácido Indolbutírico, semilla gámica.

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *Swinglea glutinosa*.

Palacio, Dayan, 2019. Development of a methodology for *in vitro* establishment of *Swinglea glutinosa*.

ABSTRACT

This research was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Panama, during the months of October 2018 and June 2019. The objective was to evaluate the response of *Swinglea glutinosa* (lemongrass) to the micropropagation, through apexes and axillary buds from *in vitro* germination of gametic seeds and their response to the presence of growth regulators (Gibberellic Acid, Benzylaminopurine and Indolbutyric acid). These seeds for disinfection were immersed in a solution of Sodium Hypochlorite (NaClO) at a concentration of 1.25% during different immersion times (15 and 30 minutes). A completely randomized design was used. For the three stages, the basic medium Murashige and Skoog (1962) was used, supplemented with growth regulators: Gibberellic Acid (1 mg / l, 2 mg / l, 3 mg / l), Benzylaminopurine (1mg / l, 2 mg / l), Indolbutyric Acid (0.1 mg / l). The effect of the treatments was evaluated during each of the stages of *in vitro* culture (Establishment and Multiplication). The best results for the disinfectant effect of Sodium Hypochlorite (NaClO) was achieved with a 30 minute immersion. The analysis of variance carried out through the SAS computer system: In the establishment stage the treatment that reached the highest plant height was AG 1 ppm with an average of 4.54cm. Highly significant differences in leaf and shoot production were found with the application of BAP (1, 2) ppm in the Multiplication stage. The highest rate of shoot production was reached in the first subculture with a Multiplication Coefficient (CM) of 2.63.

Keywords: *Swinglea glutinosa*, Gibberellic Acid, Benzylaminopurine, Indolbutyric acid, gametic seeds.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.2 Antecedentes.....	5
1.3 Justificación.....	5
1.4 OBJETIVOS	7
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	7
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
1.5 HIPÓTESIS.....	8
1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES.....	8
1.6.1- ALCANCES	8
1.6.2 LIMITACIONES	9
2. REVISIÓN DE LITERATURA	10
2.1 Origen y Distribución de <i>Swinglea glutinosa</i>	10
2.1.1- Origen de <i>Swinglea glutinosa</i>	10
2.1.2- Distribución	10
2.2 Descripción Botánica	11
2.3- Características Botánicas	12
2.3.1- Altura.....	12
2.3.2 Hojas.....	12
2.3.3 Inflorescencia.....	12
2.3.4 Fruto	12
2.3.5 Semillas	13

2.4 Ecología de Swinglea glutinosa	13
2.4.1 Suelo.....	13
2.4.2 Riego	13
2.4.3 Usos.....	13
2.4.4 Temperatura.....	14
2.4.5 Fotoperiodo	14
2.5 Historia del Cultivo de Tejidos	14
2.5.1 Fundamentos del cultivo de tejidos vegetal	16
2.5.2 Totipotencia celular	16
2.5.3 Desdiferenciación / Rediferenciación.....	17
2.5.4 Reguladores de crecimiento vegetal	17
2.6 Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	18
2.6.1 Establecimiento	18
2.6.2 Etapa de Multiplicación.....	19
2.6.3 Etapa de Enraizamiento	20
2.6.4 Etapa de Aclimatación	20
2.7 Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	20
2.7.1 Ventajas	20
2.7.2 Desventajas	21
2.8- Concepto de Micropropagación	21
2.8.1 – Técnica utilizada en la Micropropagación de <i>Swinglea glutinosa</i>	22
2.9 – Los factores que afectan a la Micropropagación	22
2.9.1 – Planta donadora del explante	22
2.9.2 El explante.....	23
2.9.3 Medio de Cultivo	23
2.10 Sala de Crecimiento.....	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Descripción del Estudio.....	25
3.2 Materiales	26
3.2.1 Medio de cultivo.....	26
3.3 MÉTODOS.....	29
3.3.1 Diseño Experimental	29
3.4 Variables a evaluar	30

3.5 Establecimiento del ensayo	31
3.5.1 Preparación de medios de cultivo	31
3.5.3 Tratamiento de desinfección de las semillas	34
3.5.4 Evaluación del efecto desinfectante del Hipoclorito de Sodio	35
3.5.5 Etapa de Iniciación o establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	36
3.5.6 Etapa de Multiplicación	37
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Efecto desinfectante del Hipoclorito de sodio al 1.25% a los 7 días	38
4.2 Etapa de iniciación o establecimiento	39
4.2.1 Altura de las plantas	39
4.2.2 Número de hojas por planta	42
4.2.3 Número de yemas	44
4.3 Etapa de Multiplicación	47
4.3.1 Brotes por explante	47
4.3.2 Número de Yemas	50
4.3.3 Longitud de brotes	53
4.4 Primer subcultivo	55
4.4.1 Brotes por explante	55
4.4.2 Número de yemas	58
4.4.3 Longitud de brotes	61
4.5 Segundo Subcultivo	62
4.5.1 Brotes por explante	62
4.5.2 Número de yemas	63
4.5.3 Longitud de brotes	65
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE CUADROS

No	Título	Pag
I	MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Swinglea glutinosa</i>	26
II	MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Swinglea glutinosa</i>	26
III	MATERIALES NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE <i>Swinglea glutinosa</i>	27
IV	COMPONENTES NECESARIOS PARA LA PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG	28
V	TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA EL ESTBLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Swinglea glutinosa</i>	36
VI	TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Swinglea glutinosa</i>	37
VII	RESULTADO DE ANALISIS DE VARIANZA PARA ALTURA EN ESTABLECIMIENTO	39
VIII	ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA ALTURA EN ESTABLECIMIENTO	40
IX	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE HOJAS EN ESTABLECIMIENTO	42
X	COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS EN ESTABLECIMIENTO	43
XI	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE YEMAS EN ESTABLECIMIENTO	44
XII	COMPARACION DE MEDIAS PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN ESTABLECIMIENTO	45
XIII	COMPARACION DE MEDIAS DE CONCENTRACIÓN PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.	46
XIV	RESULTADO DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA BROTES POR EXPLANTE EN MULTIPLICACIÓN	47

XV	ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA BROTES POR EXPLANTE EN MULTIPLICACIÓN	48
XVI	RESULTADO DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE YEMAS EN MULTIPLICACIÓN	50
XVII	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE HORMONA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN LA ETAPA DE MULTIPLICACION.	51
XVIII	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CONCENTRACIÓN PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.	52
XIX	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.	53
XX	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CONCENTRACIONES PARA LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.	54
XXI	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE BROTES POR EXPLANTE EN EL PRIMER SUBCULTIVO.	55
XXII	ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA LA VARIABLE BROTES POR EXPLANTE PRIMER SUBCULTIVO	56
XXIII	RESULTADO DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NUMERO DE YEMAS EN EL PRIMER SUBCULTIVO.	58
XXIV	ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN EL PRIMER SUBCULTIVO	59
XXV	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE LONGITUD EN EL PRIMER SUBCULTIVO.	61
XXVI	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE BROTES EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.	62
XXVII	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.	63
XXVIII	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS HORMONAS PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.	64
XXIX	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE LONGITUD EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.	65

XXX	COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN DE <i>Swinglea glutinosa</i> OBTENIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO DE MULTIPLICACION	66
-----	--	----

INDICE DE FIGURAS

No	Título	Pag
1	Soluciones madre para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1980)	32
2	Inmersión de los frutos de <i>Swinglea glutinosa</i> en agua y jabón	33
3	Extracción de semillas de <i>Swinglea glutinosa</i>	33
4	Desinfección superficial de semillas de <i>Swinglea glutinosa</i> con Hipoclorito de Sodio	34
5	Eliminación de la testa de la semilla para su posterior siembra	35
6	Plantas en Etapa de Establecimiento	41
7	Plantas en Etapa de Multiplicación	49

ÍNDICE DE GRÁFICAS

No	Título	Pag
1	Medias de Mínimos Cuadrados para la variable altura en Establecimiento	41
2	Medias de Mínimos Cuadrados para la variable número de hojas en Establecimiento	43
3	Medias de Mínimos Cuadrados para la variable brotes por explante en Multiplicación	49
4	Número de yemas por explante en Multiplicación	51
5	Medias de Mínimos Cuadrados para la variable brote por explante en el primer subcultivo	57
6	Medias de Mínimos Cuadrados para la variable número de yemas en el primer subcultivo	60
7	Número de yemas en el segundo subcultivo	64
8	Coeficiente de Multiplicación	66

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la agronomía se manejan un gran número de plantas, de las cuales la mayoría están destinados al consumo y a la alimentación humana y animal.

Actualmente también se cultiva una gran variedad de plantas con fines ornamentales, las cuales se comercializan con fines decorativos ya que poseen muchas características estéticas.

Dentro de las plantas ornamentales también son cultivadas aquellas plantas destinadas para el establecimiento de cercas vivas.

Las barreras generalmente se cultivan en curvas a nivel, principalmente en las laderas, con el propósito de controlar la erosión. Poseen la característica de que se manejan tupidas, en los surcos con alta densidad; por este motivo actúan como barreras. (García, 2011).

El uso de barreras vivas para la protección perimetral de predios y fincas se ha hecho muy popular en nuestro medio durante los últimos años, sumado a esto las mismas contribuyen a reducir la erosión, ya que, estas retienen la tierra que arrastra el agua.

La especie *Swinglea glutinosa*, conocida comúnmente como Limoncillo pertenece a la familia Rutaceae. Esta familia abarca un gran número de géneros y especies, entre ellos Citrus, Poncirus y Fortunella son los géneros más explotados comercialmente a nivel mundial, sin embargo, hay otros menos abordados, como el género *Swinglea* cuya única especie es *S. glutinosa*.

El principal uso del limoncillo ha sido para la implementación de cercas vivas para protección perimetral, barreras rompe viento y también con fines ornamentales debido a su hábito de crecimiento y resistencia a la poda.

Las cercas vivas elaboradas con limón ornamental, en este caso en específico con limoncillo o limón Swinglea, se caracterizan por ser vistosas, muy cerradas y bastante espinosas, lo que hace que sean muy decorativas y a la vez bastante seguras. Se adapta fácilmente a las condiciones climáticas en la zona tropical. Además, la producción de biomasa puede funcionar como abono verde en el predio.

Una de las principales limitantes a la hora de producir plantas ornamentales es la utilización de una técnica que permita la propagación masiva y de forma rápida de las plantas y que las mismas estén en buenas condiciones de sanidad y que conserven su identidad genética.

La propagación del limoncillo tradicionalmente se hace a través de sus semillas sexuales. Generalmente presenta dificultades como lo son una baja tasa de germinación o plantas débiles que posteriormente no se adaptan a condiciones de campo.

Poner en práctica otra metodología de propagación eficaz del limoncillo, resulta de gran importancia en la agricultura. Mediante la utilización de la Biotecnología Vegetal y la técnica de micropropagación se ha logrado cultivar de manera *in vitro* un sin número de especies vegetales de manera exitosa, por lo que utilizar estas técnicas para la micropropagación del limoncillo puede ser una interesante opción

en la búsqueda de implementar una metodología estandarizada, donde las plantas puedan propagarse masivamente en muy corto tiempo

La Biotecnología Vegetal es un conjunto de técnicas fundamentadas en diferentes ciencias. Se recurre al cultivo de tejidos cuando se busca una producción masiva de una determinada planta. Para llevarlo a cabo se debe tomar una porción (explante) de una planta madre.

Para esta investigación se utilizaron semillas gámicas de limoncillo germinadas *in vitro*, para entonces, a partir de ellas obtener brotes y yemas axilares las cuales se utilizan como explantes iniciales en la etapa de establecimiento.

Con el uso de la micropropagación se asegura que las futuras plántulas estén libres de patógenos y en buen estado; debido a que al ser cultivadas bajo condiciones totalmente asépticas se puede evitar la presencia de patógenos que atacan al cultivo generalmente en etapas iniciales y durante su crecimiento, también con la micropropagación se consigue una multiplicación más rápida en comparación con los métodos convencionales y se mantiene la identidad genética.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El limón Swinglea ha tomado valor e importancia hoy en día, se ha caracterizado por su gran utilidad tanto como para barreras viva para le seguridad de las fincas además de servir para el embellecimiento de ciertas zonas.

El limoncillo es un árbol que resulta ser de mucho beneficio para los productores, personas con grandes extensiones de terreno, ya que funciona excelente como barreras vivas, resulta bastante decorativo, es resistente a la poda y también funciona como abono verde al igual que ayuda a la fijación del Nitrógeno en el suelo.

El uso de cercas vivas en Centroamérica es una práctica común dentro de las fincas. Las cercas vivas se definen como líneas de varios árboles o arbustos sobre los cuales se fijan varios hilos de alambre con la finalidad de establecer los límites de un territorio y los cultivos agrícolas y dividir extensas áreas de potrero en áreas más pequeñas. (Budowski y Russo 1993).

Durante los últimos años se ha incrementado la demanda de plantones de limoncillo, fundamentalmente para el establecimiento de cercas vivas, ya que, por ser una especie que produce espinas largas, garantiza la seguridad perimetral de los linderos de propiedades o fincas. Es importante agregar que, si se maneja correctamente la poda, también ofrece un aspecto estético muy llamativo.

La producción de plantones de limoncillo es cada vez más reducida ya que los métodos utilizados tradicionalmente para su propagación no están dando los resultados esperados, teniendo una baja tasa de germinación.

1.2 Antecedentes

Swinglea glutinosa es originaria de Filipinas, donde el uso que se le daba a esta planta era con fines medicinales, utilizando el jugo de la fruta para tratar afecciones de la piel. Otros estudios han demostrado que los extractos de esta especie tienen propiedades antiplasmodiales (actividad contra bacterias del género *Plasmodium*). Se ha demostrado que los extractos de aceites esenciales de esta especie tienen actividad anti tubercular (acción bacteriostática contra *Mycobacterium tuberculosis*) *in vitro*. En el continente asiático esta reportada con actividad anti fúngica (actividad contra hongos).

1.3 Justificación

La propagación de este arbusto por lo general se realiza de dos formas, la primera de ellas es la propagación por semilla gámica y la segunda es mediante la utilización de esquejes.

La propagación por semilla gámica consiste en colocar las semillas previamente extraídas de sus frutos y colocadas en un sustrato para su germinación. Este método al igual que la propagación por esqueje no muestran los resultados esperados ya que se da una baja tasa de germinación de las semillas o los esquejes utilizados no generan brotes nuevos. Estos resultados negativos también pueden ser debido a factores propios de la semilla que se utiliza, o a que

no se le brindas los cuidados técnicos necesarios para la germinación tal como es el tipo de sustrato ideal.

Para su propagación mediante semilla gámica se debe resaltar que las semillas de limoncillo están recubiertas por un gel primeramente y luego de una testa que es una capa derivada del tegumento externo de la semilla. Estas estructuras que posee la semilla hacen que sea más difícil para el embrión poder germinar como se desea, debido a que la testa es por lo general una capa de consistencia dura y resistente y su principal función es la de proteger a la semilla ante condiciones climáticas desfavorables.

Ambas vías tradicionales de propagación de limoncillo dan como resultado una baja tasa de germinación y un bajo porcentaje de plantas establecidas.

Para satisfacer la demanda actual de limoncillo por sus beneficios como cerca viva es necesario contar con una buena cantidad de plantones y estos en perfecta condición de sanidad.

La manera más conveniente para la producción masiva de plantas y libres de enfermedades es mediante las técnicas de Biotecnología Vegetal. Para esto la realización de este trabajo es para poder determinar cuál es la mejor manera o encontrar un protocolo útil para la correcta y mejor propagación *in vitro* de *S. glutinosa*.

La justificación de este trabajo de investigación está orientada a utilizar otra alternativa para propagar el limoncillo en condiciones asépticas y evaluar así su respuesta ante dicha metodología.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la respuesta del limoncillo *Swinglea glutinosa* a la micropropagación a través de ápices y yemas axilares provenientes de la germinación *in vitro*.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar el efecto desinfectante del Hipoclorito de sodio al 1.25% y distintos tiempos de inmersión sobre la desinfección de semillas gámicas de limoncillo *S. glutinosa*.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio Murashige y Skoog, sobre el establecimiento *in vitro* del limoncillo.
- Evaluar la tasa de producción de brotes de limoncillo a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio Murashige y Skoog.

1.5 HIPÓTESIS

Ho: No existen diferencias significativas entre los tratamientos con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento sobre el establecimiento y multiplicación de *S. glutinosa*.

Ha: Existen diferencias significativas entre los tratamientos con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento sobre el Establecimiento y Multiplicación de *S. glutinosa*.

1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES

1.6.1- ALCANCES

Con la realización de esta investigación se puede determinar la respuesta del limoncillo a la micropropagación. Generalmente durante la primera etapa que es la de establecimiento se presenta un alto nivel de contaminación *in vitro*, con el presente estudio se puede determinar la manera correcta de llevar a cabo el establecimiento, superando con éxito el problema de la contaminación.

Además de conocer la respuesta que tienen los explantes al ser sometidos a técnicas de micropropagación, se podrán estimar datos numéricos sobre el promedio de la densidad de plántulas que pueden llegarse a obtener.

El resultado de esta metodología favorece a los viveristas y personas interesadas en limoncillo, gracias a que, pueden obtener un número de plantas superior y en menos tiempo a los que generalmente se producen de manera convencional las plantas de esta especie. Aunado a esto estarán seguros de obtener plantas sanas libre de enfermedades.

1.6.2 LIMITACIONES

En Panamá no existen estudios de investigación acerca de la micropropagación de *Swinglea glutinosa*; por lo que se hizo necesaria la inversión de tiempo en encontrar las técnicas que más se adecuan para el establecimiento y propagación *in vitro* de esta especie.

Se debe contar con un laboratorio equipado correctamente para poder realizar las labores correspondientes a esta técnica de propagación.

En las prácticas de laboratorio de Biotecnología, es importante mantener una asepsia total a la hora de la preparación de los medios de cultivos, que serán la fuente de nutrientes para las semillas y futuras plántulas. De igual manera la manipulación de los tejidos vegetales se debe realizar con mucho cuidado y en condiciones asépticas, de lo contrario se presentan contaminaciones en el material cultivado

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y Distribución de *Swinglea glutinosa*

2.1.1- Origen de *Swinglea glutinosa*

Swinglea es un género monotípico de plantas, pertenece a la familia Rutaceae. *Swinglea glutinosa* es la única especie y es exclusivamente originaria del continente asiático y es endémica en Filipinas.

El “Tabog”, como se conoce esta especie en Filipinas, oriundo de la Isla Luzón. Se intentó utilizar esta especie la cual crecía al aire libre en Manila, como patrón de injerto de vástagos de Citrus, pero fue imposible.

2.1.2- Distribución

Fue introducida en América después de la primera guerra mundial en los países de Sudamérica y Centroamérica, donde fue introducido inicialmente a Colombia por los productores de caña, principalmente se encuentra distribuida en las zonas cálidas y cafetaleras. En el departamento de Cundinamarca se cultiva en el valle del Río Magdalena en los municipios comprendidos entre Girardot y Puerto Salgar desde donde fue distribuido hacia América latina. Comúnmente *S. glutinosa* es utilizada mayormente conocida como limoncillo o limón ornamental es utilizada como cercas vivas o setos. (Segovia *et al.*, 2000).

Desde la primera guerra mundial el limoncillo se ha introducido a muchos países de América central y del sur.

El limoncillo fue reportado en Panamá por primera vez en los jardines experimentales de Las cumbres, dentro de la zona del Canal por J.E Haggins, s.f. (University of California Riverside, s.f)

En el país, *S. glutinosa* ha tomado importancia tanto para fines agrícolas como ornamentales, ya que es utilizada como barreras vivas y como decoraciones en parques y jardines. Hasta el momento, en Panamá no se cuenta con registros ni datos acerca plantas de limoncillo que hayan sido propagadas por métodos de laboratorio a través del cultivo de tejidos.

2.2 Descripción Botánica

- **Género: Swinglea**
- **Especie: glutinosa**

Swinglea glutinosa es un árbol perteneciente a la familia Rutaceae, esta familia abarca un gran número de géneros y especies, sin embargo, el género Swinglea es el menos abordado y explotado comercialmente, el cual posee una sola especie (*S. glutinosa*).

Fue traído hasta América desde el Sureste de Asia. En la actualidad se utiliza como planta ornamental mayormente en Colombia y como barrera viva en las zonas rurales y de cultivos y ganadería.

Este árbol posee frutos que no son comestibles, pero tienen un olor agradable. Se distribuye entre 0 y 1500 metros sobre el nivel del mar, donde la temperatura se eleva hasta los 37°C en verano y desciende a -6°C.

2.3- Características Botánicas

2.3.1- Altura

La planta *Swinglea glutinosa* es un arbusto leñoso que crece hasta 15 metros de altura y 40 centímetros DAP (diámetro del árbol) y es de un tronco no muy grueso.

2.3.2 Hojas

Miden 15 centímetros de largo por 40 centímetros de ancho, son alternas compuestas y están formadas por tres folíolos; con un folíolo terminal del doble del largo que los otros, de color verde oscuro.

2.3.3 Inflorescencia

Sus flores miden 1.5 centímetros de largo por un centímetro de ancho, sus pétalos son de color verde amarillento, su cáliz es de color verde, su gineceo tiene forma de pequeñas botellas y están dispuestas en inflorescencias en forma de pequeños racimos terminales

2.3.4 Fruto

Sus frutos miden 10 cm de largo por 7 cm de diámetro, tienen forma elíptica, su superficie es rugosa y su color es verde, parecidos a un limón grande, su cáscara es gruesa, son fragantes, su pulpa es de color amarillo y cada uno de los frutos contiene numerosas semillas.

2.3.5 Semillas

Las semillas de *S. glutinosa* miden 10 mm de largo, 5 mm de ancho y 1 mm de grosor, son de color amarillo y algo aplanadas, tienen forma de elipse y conservan algo de fibra en su interior.

2.4 Ecología de *Swinglea glutinosa*

2.4.1 Suelo

Un suelo ideal para que crezca y se desarrolle bien este arbusto deben ser suelos bien drenados, aireados y fértiles con Ph entre 5 y 7, con buena disponibilidad de elementos mayores, especialmente fósforo, potasio y calcio y bases intercambiables. (Institución Educativa Presbítero Daniel Jordan, 2006)

2.4.2 Riego

Generalmente después de los 6 meses del plantado definitivo, y hasta el primer año por lo menos, es recomendable el riego regular, a partir de allí el riego se hace necesario en los momentos de sequías.

2.4.3 Usos

Este árbol es utilizado principalmente para la implementación de cercas vivas dentro de los terrenos agrícolas y pecuarios y de igual manera se utiliza con fines ornamentales, decorativos debido a su tipo de crecimiento.

Son múltiples los beneficios que brinda este árbol al ser usado dentro del sector agropecuario. Por otro lado, en Filipinas también es utilizado con fines medicinales para tratar afecciones de la piel. También se ha demostrado que los extractos de aceites esenciales de éste árbol tienen acción anti tuberculal *in vitro*.

2.4.4 Temperatura

Se adaptan en climas donde la temperatura media es de 20 a 24°C y lluvia anual de 800 a 2000 mm.

2.4.5 Fotoperiodo

Recientes investigaciones han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis (Villalobos et al.,1984).

Son bastantes exigentes en luz debido a que es una especie de crecimiento rápido.

2.5 Historia del Cultivo de Tejidos

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir del siglo XIX aproximadamente, con los primeros intentos realizados por Sacks (1960) y Knops (1961), quienes prepararon una solución nutritiva de sustancias inorgánicas que contenían los principales nutrientes para las plantas superiores; esta solución es utilizada desde entonces por muchos investigadores.

El cultivo de tejidos está compuesto por una serie de técnicas que permiten la propagación y multiplicación de especies vegetales. Dichas técnicas se basan principalmente en aprovechar la totipotencia que tienen las células vegetales, sobre todo y más importante generar plantas sanas, libres de microorganismos como virus, bacterias y hongos.

Las técnicas del cultivo de tejido incluyen la utilización de un explante, el cual es extraído de una planta madre, estos explantes pueden ser protoplastos, células órganos y tejidos.

Cuando nos referimos a el cultivo *in vitro* de vegetales se refiere a que todo el proceso de las plantas se llevará a cabo dentro de recipientes especiales para este fin o en tubos en donde la planta se le brindará un ambiente artificial para su desarrollo.

Para realizar el cultivo de tejidos es importante tener en cuenta las características de dicha técnica, las cuales son: un manejo estricto de la asepsia, luz, temperatura y humedad relativa; que son los factores que van a influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La importancia del cultivo de tejidos radica en que se pueden generar plantas sanas, en un tiempo relativamente corto y que también pueden ser mejoradas para el beneficio de la población con la ayuda de la Biotecnología Vegetal, al igual que generar información y nuevos descubrimientos de mucho beneficio para el futuro.

2.5.1 Fundamentos del cultivo de tejidos vegetal

Una buena respuesta en los cultivos *in vitro* dependerá de los fundamentos principales que son:

2.5.2 Totipotencia celular

La totipotencia es una característica de las células de las plantas, la cual permite que, a partir de una única célula, se genere una planta nueva genéticamente igual a la planta madre, todo este proceso sin la necesidad que intervengan ningún tipo de fusión de células de tipo sexuales o gametos, como principalmente se forma una nueva planta. La totipotencialidad celular es característico de un tipo de células vegetales conocidas como células meristemáticas. Las células meristemáticas son aquellas que están situadas tanto en el ápice del tallo como en el ápice de las raíces. De estas células meristemáticas empiezan a diferenciarse nuevas células y va dando forma a las nuevas partes de la planta.

Gracias a técnicas de cultivo *in vitro* se puede hacer que una célula de la hoja, tallo, o raíz recupere la totipotencia del cigoto.

2.5.3 Desdiferenciación / Rediferenciación

La Desdiferenciación es la pérdida de la capacidad de especialización y formar los órganos de una planta, es decir que las células diferenciadas terminales las cuales tienen una función específica realizan un proceso inverso en donde vuelven a un estado menos diferenciado.

Las células adultas vivas, aunque hayan alcanzado estabilidad y especialización fisiológica pueden volver a tener acción meristemática cuando son adecuadamente estimuladas. Ocurre naturalmente en las plantas cuando se originan los meristemas secundarios. Por ejemplo, el felógeno, meristema encargado de la formación de los tejidos de protección secundarios, se originan por desdiferenciación de células epidérmicas y/o subepidérmicas.

Por otro lado, la rediferenciación es la formación de nuevas células con la capacidad de diferenciarse y formar células con funciones específicas en la planta a partir de aquellas que estuvieron desdiferenciadas.

2.5.4 Reguladores de crecimiento vegetal

El cultivo de tejido vegetal tiene que tener las hormonas necesarias o bien para la organogénesis (para crecer parte aérea o subterránea) o bien para la embriogénesis (para regenerar un individuo completo), estas hormonas cambian en concentración dependiendo de la planta, aunque, las familias hormonales relacionadas al crecimiento vegetal son auxinas, citocininas y giberelinas. Con la

correcta adición y balance de estas hormonas se obtiene un cultivo totipotente. (Contreras R. , 2013)

Inicialmente una concentración mayor de auxinas con relación a citocininas beneficia a la inducción de células totipotentes, luego para el proceso de multiplicación celular se hace necesario un aumento en las concentraciones de citocininas.

Cuando se hayan formado las plántulas se le debe seguir brindando las condiciones necesarias para su crecimiento y nutrición, brindándole las hormonas que naturalmente en un ambiente *ex vitro* le brindaría aquellas células que acompañen al embrión. Finalmente, para el proceso de enraizamiento se suele utilizar un medio de cultivo suplementado con auxinas, en donde las más utilizadas, son el ácido indolacético o el ácido indolbutírico.

2.6 Etapas del cultivo *in vitro*

2.6.1 Establecimiento

El objetivo principal del establecimiento *in vitro* es la obtención de plántulas sanas, viables y en condiciones totalmente asépticas. Un factor que será realmente determinante para lograr esto, es la calidad del explante a utilizar, es decir, que se deben tomar brotes o partes jóvenes de la planta madre ya que estas están en crecimiento, por ende, las células meristemáticas están activadas, para el caso de obtención de plantas libres de virus es completamente necesario el uso de ápices meristemáticos. Junto con una buena selección del explante, el aislamiento y la esterilización de los mismos hacen que la etapa de establecimiento sea exitosa.

La desinfección superficial incluye varios pasos que comprenden desde la utilización de agua corriente, utilización de etanol en donde puede variar la concentración dependiendo la especie, hipoclorito de sodio y finalmente un mínimo de 4 enjuagues con agua destilada estéril, todo esto con el fin de minimizar al máximo la presencia de patógenos que puedan contaminar los explantes.

En algunos casos algunos patógenos permanecen latentes y expresan su desarrollo hasta que son colocados en un medio de crecimiento. Durante la etapa de establecimiento también se puede dar la contaminación por la presencia de bacterias y hongos asociados a trips que hayan sobrevivido a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes que se encuentran dentro del sistema vascular. (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, s.f.).

2.6.2 Etapa de Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar el número de brotes para los sucesivos ciclos de multiplicación (subcultivos), esto se logra haciendo cortes de las plántulas previamente establecidas.

En esta etapa es importante la presencia de los reguladores de crecimiento como las auxinas, citocininas y giberelinas, ya que, de ellos dependerá el crecimiento y formación de los nuevos brotes.

2.6.3 Etapa de Enraizamiento

En esta etapa se inducen los vástagos producidos luego de los subcultivos anteriores, a la producción de raíces, mediante la aplicación principalmente de auxinas en el medio de cultivo. Debe haber un balance entre auxinas y citocininas, en concentraciones bajas y siempre mayor cantidad de auxinas.

2.6.4 Etapa de Aclimatación

Es una etapa bastante crítica dentro del cultivo *in vitro* debido al estrés que sufren estas al estar sometidas al clima *ex vitro*, las plántulas sufren una alta evapotranspiración, por lo que la supervivencia de las plantas se ve afectada.

Se utilizan una mezcla de diferentes sustratos como tierra, arena y sustratos comerciales. La etapa de aclimatación debe darse dentro de un invernadero con una humedad relativa controlada.

2.7 Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*

2.7.1 Ventajas

- Producción masiva de plantas en un periodo de tiempo relativamente corto.
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado.
- Eliminación de virus mediante el cultivo de meristemas.
- Obtención de plantas en cualquier época del año.
- Conservación de germoplasma.
- Facilidad para el intercambio internacional de material vegetal.

2.7.2 Desventajas

- Se requiere personal entrenado
- Se requiere infraestructura y equipamiento
- Equipo costoso
- Contaminación *in vitro*.

2.8- Concepto de Micropropagación

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivar plantas utilizando esta técnica de la biotecnología resulta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos.

Dependiendo de las características de la planta que se desea propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brote de yemas adventicias, producción de yemas de Novo y embriogénesis somática. (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología)

2.8.1 – Técnica utilizada en la Micropropagación de *Swinglea glutinosa*

2.8.1.1 – Método de los segmentos nodales

Para la realización de este método se utilizan las yemas axilares o primordios de las hojas para luego ser divididos y subcultivados. Este método es el que más se utiliza comercialmente debido a la facilidad con la que se propagan gran mayoría de especies. Las plantas generadas por esta metodología suelen mantener una buena estabilidad genética.

2.9 – Los factores que afectan a la Micropropagación

2.9.1 – Planta donadora del explante

La correcta elección del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son, la contaminación por microorganismos y la oxidación del explante. La selección del explante es un aspecto clave para tener éxito en el cultivo de tejidos, ya que, dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiología y de su contenido endógeno de hormonas se comportará de una manera u otra.

2.9.2 El explante

Los explantes seleccionados para la micropropagación *in vitro* deben pasar por un proceso de desinfección superficial para eliminar cualquier microorganismo que pueda ser fuente de contaminación y que vaya a causar problemas en el establecimiento del cultivo.

El tamaño del explante generalmente no tiene gran influencia. A menos que, se desee propagar plantas que se encuentren libres de virus, se suelen utilizar los meristemas ya que son las partes de la planta que tienen más probabilidades de estar libre de estos microorganismos.

2.9.3 Medio de Cultivo

De acuerdo con Gamborg et al. (1976) el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

Uno de los factores más importantes que influye en la morfogénesis y el crecimiento de los tejidos de la planta es la composición del medio de cultivo. Los componentes de los medios para el cultivo de tejidos incluyen macronutrientes, micronutrientes, un suplemento de hierro, vitaminas, una fuente de carbono y usualmente reguladores de crecimiento. (Contreras C. , 2016).

2.10 Sala de Crecimiento

Las plantas cultivadas *in vitro* son colocadas luego en el área de crecimiento o de incubación. Este es un cuarto apropiado en donde debe haber gabinetes o cámaras de crecimiento; estas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental. El área de incubación o crecimiento *in vitro* debe proporcionar un buen control de la temperatura, de la iluminación y de la humedad relativa.

Es necesario propiciar una buena distribución del aire en esta sala para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces. Cuando se utilizan tubos fluorescentes, es conveniente sacar los balastos fuera de la sala.

La regulación de la temperatura se puede lograr por medio de aires acondicionados. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles para cortar la iluminación cuando falle el aire acondicionado. (CIAT, s.f.)

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del Estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en su sede de la provincia de Chiriquí.

El estudio buscaba desarrollar una metodología para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Swinglea glutinosa*, ante la presencia de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento como ácido giberélico, bencilaminopurina y ácido Indolbutírico.

Para estas etapas se utilizó como medio base el medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con reguladores de crecimiento y con modificaciones de PH a 5.8.

Inicialmente se realizó un ensayo para evaluar la efectividad de utilizar una batería de desinfección a base de hipoclorito de sodio al 1.25%. Dicha desinfección está destinada a eliminar patógenos que puedan causar problemas posteriores de contaminación en la etapa de establecimiento que por lo general es la etapa en donde lograr obtener plantas sanas libres de patógenos para las siguientes etapas es algo esencial.

Se sembraron 75 semillas en tubos de ensayo a razón de una semilla por tubo. Esta batería de desinfección fue evaluada a los 7 y a los 15 días después de la siembra.

3.2 Materiales

3.2.1 Medio de cultivo

Cuadro I: MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Swinglea glutinosa*

Trat	Componentes	Componentes	Componentes
1	Sales MS + Gelrite	Sales MS + Gelrite	Sales MS + Gelrite
2	Sales MS + Gelrite + 1ppm AG	Sales MS + Gelrite	Sales MS + Gelrite + 0.1ppm AIB
3	Sales MS + Gelrite + 2ppm AG	Sales MS + Gelrite + 1ppm BAP	Sales MS + Gelrite + 0.1ppm AIB
4	Sales MS + Gelrite + 3ppm AG	Sales MS + Gelrite + 2ppm BAP	Sales MS + Gelrite + 0.1ppm AIB

Fuente: El autor

Cuadro II: MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *Swinglea glutinosa*

Trat	Componentes	Componentes
1	Sales MS + Gelrite	Sales MS + Gelrite
2	Sales MS + Gelrite + 1ppm AG	Sales MS + Gelrite + 2ppm BAP
3	Sales MS + Gelrite + 2ppm AG	Sales MS + Gelrite
4	Sales MS + Gelrite + 3ppm AG	Sales MS + Gelrite + 1ppm BAP

Fuente: El autor

Cuadro III: MATERIALES NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Swinglea glutinosa*

Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Material vegetal: fruto de *Swinglea glutinosa*

Alcohol 70%

Microondas

Cloro

Agitadores magnéticos

Jabón Antibacterial

Autoclave

Tubos de ensayo

Refrigerador

Frascos de vidrio para la multiplicación

Vasos químicos

Balanza analítica

Pinzas de Laboratorio

Bisturí

Reguladores de crecimiento

Cámara de flujo laminar

Fuente: El autor

CUADRO IV: COMPONENTES NECESARIOS PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (1980)

	Componentes	Murashige y Skoog mg/L
I	MACRONUTRIENTES	
	Nitrato de Amonio NH ₄ NO ₃	1650
	Sulfato de Magnesio MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
	Fosfato de Monopotásico KH ₂ PO ₄	170
	Cloruro de Calcio CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
	Nitrato de Potasio KNO ₃	1900
II	MICRONUTRIENTES	
	Ácido Bórico H ₃ BO ₃	6.2
	Sulfato de Manganeso Mn SO ₄ ·H ₂ O	22.23
	Sulfato de Zinc ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
	Molibdato de Sodio Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
	Sulfato de CobreCuSO ₄ · 5H ₂ O	0.05
	Cloruro de cobalto CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.05
	Yoduro de Potasio KI	0.83
III	QUELATOS DE HIERRO	
	Sulfato Ferroso FeSO ₄ · 7H ₂ O	37.3
	Na ₂ EDTA	27.8
IV	VITAMINAS	
	Tiamina-HCL	0.1
	Ácido Nicotínico	0.5
	Glicina	2
	Piridoxina-HCL	0.5
V	Reguladores de crecimiento	
	MYO-Inositol	0.1
	Bencilaminopurina	0.05
	Ácido Giberélico	0.05
	Ácido Indolbutírico	0.05
VI	FUENTES DE CARBONO	
	Sacarosa	30000
VII	Agente Gelificante	
	Gelrite	300.5

Fuente: El Autor

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Diseño Experimental

En el presente estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) se utilizaron 3 combinaciones de reguladores de crecimiento.

El modelo Lineal aditivo fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (A*B*C)_{ijk} + E_{ijkl}.$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable de respuesta medida

μ = Media poblacional

A_i = Efecto del Ácido Giberélico

B_j = Efecto de la Bencilaminopurina

C_k = Efecto del Ácido Indolbutírico

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el Ácido Giberélico con la Bencilaminopurina

$(AC)_{ik}$ = Efecto de la interacción del Ácido Giberélico con el Ácido Indolbutírico

$(BC)_{jk}$ = Efecto de la interacción de la Bencilaminopurina con el Ácido Giberélico

$(A*B*C)_{ijk}$ = Efecto de la interacción entre el Ácido Giberélico, la Bencilaminopurina y el Ácido Indolbutírico

E_{ijkl} = Efecto del error experimental

3.4 Variables a evaluar

Las variables a evaluar fueron tomadas en las etapas desde la inoculación de las semillas de limoncillo, su establecimiento, multiplicación y los dos posteriores subcultivos.

Establecimiento:

- Altura de las plantas a los 45 días de haber sido establecidas las semillas de limoncillo.
- Número de hojas por planta a los 45 días.
- Número de yemas por planta a los 45 días.

Multiplicación y subcultivos:

- Número de brotes por explante después de 45 días de la multiplicación.
- Longitud de brotes a los 45 días de la multiplicación.
- Número de yemas después de 45 días de la multiplicación.

Para cada una de las variables, en las diferentes etapas se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), mediante el procedimiento GLM del programa computacional SAS (SAS Institute, 1998).

De encontrarse significancia en alguna de las fuentes de variación, se procederá a realizar una prueba de amplitud múltiple de medias de Tukey y una prueba LSD de Fisher en caso de haber diferencia significativa en la interacción.

3.5 Establecimiento del ensayo

3.5.1 Preparación de medios de cultivo

El éxito de una micropropagación consiste en gran parte en el medio de cultivo adecuado para el tipo de explante o planta que se va a propagar. De entre la gran diversidad de medios de cultivo *in vitro* utilizados habitualmente, el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) es el medio más conocido. Y es el que mejor se presta de acuerdo a sus componentes físicos y químicos para la propagación de especies leñosas en este caso, para la propagación de limoncillo.

3.5.1.1 Preparación de soluciones madre

El medio de cultivo se preparó a base de diluciones de soluciones madre. Estas soluciones son preparadas en alta concentración de las principales sales que componen el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). Las soluciones madre que se preparan son los macronutrientes, los micronutrientes, reguladores de crecimiento y vitaminas.



Figura 1: Soluciones madre para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Fuente: El autor

3.5.2 Introducción e inoculación de las semillas en el laboratorio

Los explantes que se usaron para este estudio, se obtuvieron a partir de la germinación *in vitro* de las semillas de limoncillo. Las semillas se extrajeron de los frutos de limoncillo. Los frutos fueron lavados con agua y jabón bajo inmersión durante 30 minutos con la finalidad de eliminar cualquier contaminante externo. Posteriormente fueron trasladados a la cámara de flujo laminar en donde fueron enjuagados con agua estéril y se procedió a extraer las semillas dentro de la cámara de flujo laminar



Figura 2: Inmersión de los frutos de limoncillo en agua y jabón
Fuente: El autor



Figura 3: Extracción de las semillas de limoncillo
Fuente: El autor

3.5.3 Tratamiento de desinfección de las semillas

La desinfección superficial de las semillas se realizó dentro de la cámara de flujo laminar con una solución de Hipoclorito de Sodio a una concentración de 1.25% durante 30 minutos y luego fueron enjuagadas 4 veces con agua destilada esterilizada.

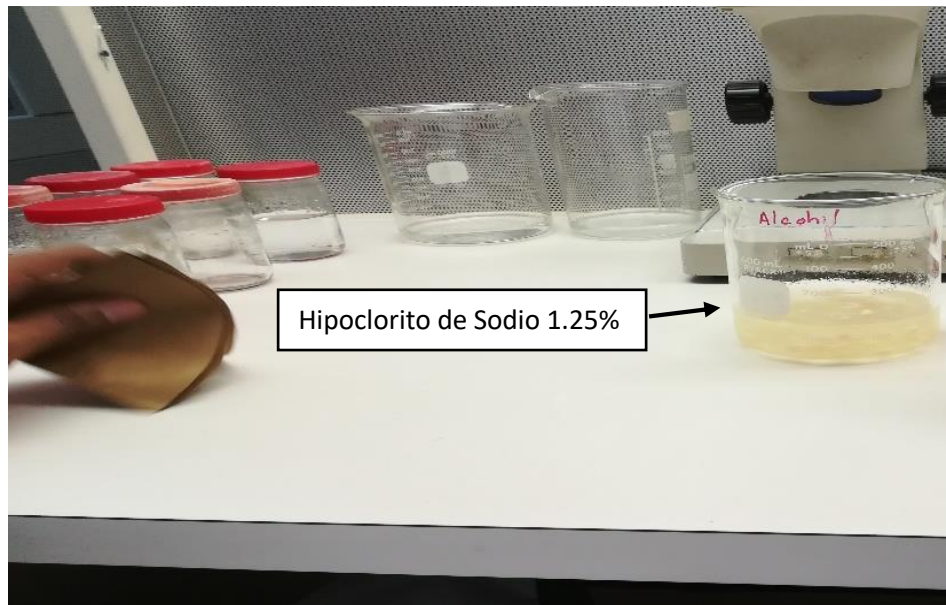


Figura 4: Desinfección superficial de las semillas con Hipoclorito de Sodio

Fuente: El autor



Figura 5: Eliminación de la testa de las semillas para su posterior siembra
Fuente: El autor

3.5.4 Evaluación del efecto desinfectante del Hipoclorito de Sodio

Para evaluar el efecto de esta batería de desinfección, después de haber sido eliminada la testa de las semillas, se sembraron 75 semillas, dentro de tubos de ensayo cada uno con 10 ml medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento. A los 7 días se cuantificó el número de explantes con necrosis y los vivos y se calculó el porcentaje de contaminación.

3.5.5 Etapa de Iniciación o establecimiento del cultivo *in vitro*

Una vez se hubo comprobado la eficacia de la desinfección de las semillas se procedió a iniciar con la siembra o establecimiento de todos los tratamientos del estudio. Esta siembra se hizo con la finalidad de generar los ápices axilares y caulinares que luego serían llevados a la etapa de multiplicación.

CUADRO V: TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Swinglea glutinosa* EN ETAPA DE INICIACIÓN.

75 semillas/Tratamiento	AG (Ácido Giberélico) mg/L	BAP (Bencilaminopurina) mg/L	AIB (Ácido indol butírico) mg / L
T1	0	0	0
T2	1	0	0.1
T3	2	1	0.1
T4	3	2	0.1

Fuente: El autor

3.5.6 Etapa de Multiplicación

En esta etapa se utilizaron los brotes provenientes de la anterior etapa de establecimiento, los cuales tenían 4 semanas de edad.

En esta etapa se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de Ácido Giberélico y Bencilaminopurina. Luego de transcurridos 45 días en la etapa de multiplicación se hicieron dos subcultivos cada 4 semanas para determinar el coeficiente de multiplicación.

CUADRO VI: TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *Swinglea glutinosa* EN ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

60 explantes/tratamiento	AG (Ácido giberélico) mg/L	BAP (Ácido indol butírico) mg/L
T1	0	0
T2	1	2
T3	2	0
T4	3	1

Fuente: El autor

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto desinfectante del Hipoclorito de sodio al 1.25% a los 7 días

Inicialmente se realizó la desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio al 1.25% por un tiempo de 20 minutos. Al hacerse la evaluación a los 7 días se cuantificaron 13 semillas contaminadas lo que correspondió a un 17% de contaminación y un total de 83% libre contaminación y no se observaron explantes con necrosis.

Luego de vistos estos resultados previos al inicio del establecimiento del ensayo, se decidió hacer un ajuste en el tiempo de desinfección a 30 minutos, lo que causó un efecto positivo teniendo como resultado un 100% plántulas libres de contaminación y ninguna plántula con necrosis.

4.2 Etapa de iniciación o establecimiento

4.2.1 Altura de las plantas

En cuanto a esta variable, el análisis de varianza (ANOVA), realizado mediante el programa computacional SAS (SAS Institute 1998) determinó una interacción Hormona x Concentración altamente significativa ($p < 0.01$). Esto indica que los efectos de hormonas y concentración están relacionados. (Cuadro VII)

CUADRO VII. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE ALTURA EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	2	22.50	0.0001**
Concentración	4	1.60	0.1764 NS
Hormona*Concentración	2	10.10	0.0001**
Error	156		
Total	164		

C.V= 23.01%

NS: No significativo.

** : Diferencia significativa al 1%.

Fuente: El autor

Debido a que los efectos de las hormonas y las concentraciones están relacionados se procedió a analizar la matriz de valores p, generadas por SAS con el objetivo de encontrar la naturaleza de esta interacción. (Cuadro VIII)

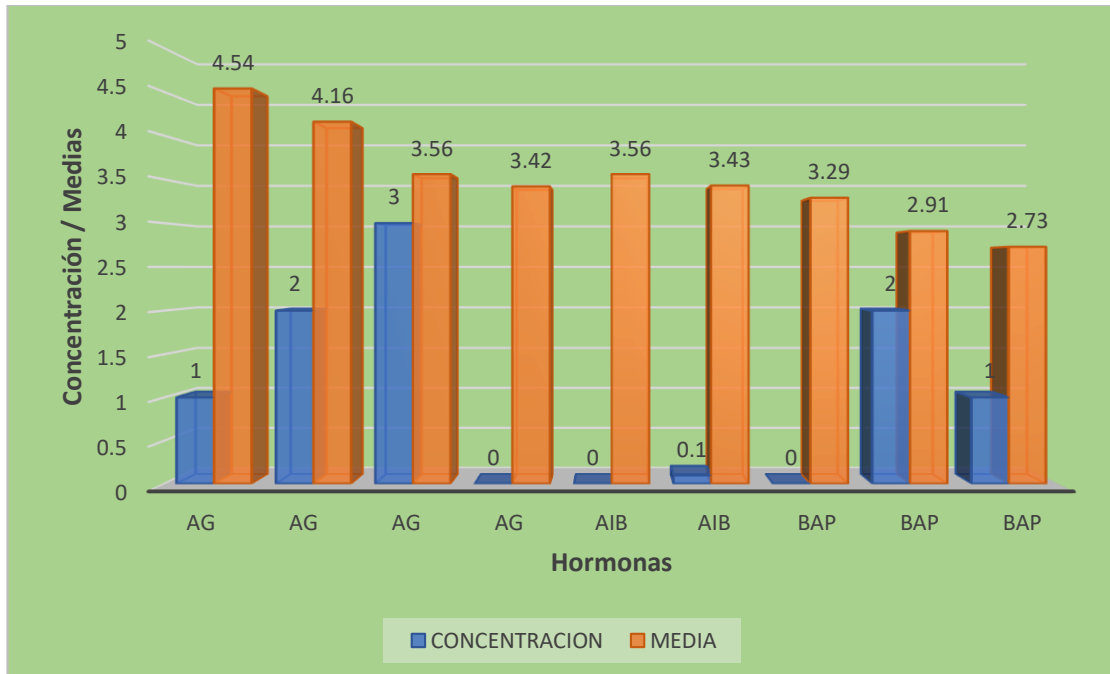
CUADRO VIII. ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA DETERMINAR LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN HORMONA X CONCENTRACIÓN EN LA VARIABLE ALTURA EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

HORMONA	CONCENTRACION	MEDIA+	AGRUPAMIENTO LSD
AG	1	4.54	a
AG	2	4.16	a
AG	3	3.56	b
AG	0	3.42	c
AIB	0	3.56	a
AIB	0.1	3.43	a
BAP	0	3.29	a
BAP	2	2.91	b
BAP	1	2.73	b

Fuente: El autor

+: Medias de Mínimos Cuadrados

Se observa efectivamente la presencia de interacción, ya que, el comportamiento de las concentraciones fue el mismo en las hormonas AG y BAP, pero fue diferente en la Hormona AIB. La media más alta se alcanzó con el tratamiento que consistía en AG (Ácido Giberélico) a una concentración de 1 ppm la cual fue 4.54 centímetros.



Gráfica 1: Medias de mínimos cuadrados para la interacción hormona x concentración para la variable altura en Establecimiento.

Fuente: El autor



Figura 6: Etapa de Establecimiento

Fuente: El Autor

4.2.2 Número de hojas por planta

El análisis de varianza determinó una interacción hormona x concentración altamente significativa ($P < 0.01$). Esto indica que el efecto hormona y concentración están relacionados. Debido a esto se procedió a analizar la matriz de valores P generados por SAS con el objetivo de encontrar la naturaleza de esta interacción. (Cuadro IX)

CUADRO IX. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	2	11.33	0.0001**
Concentración	4	1.38	0.2444 NS
Hormona*Concentración	2	14.39	0.0001**
Error	156		
Total	164		

C.V= 17.04%

** : Diferencia altamente significativa al 1%.

NS: No significativo.

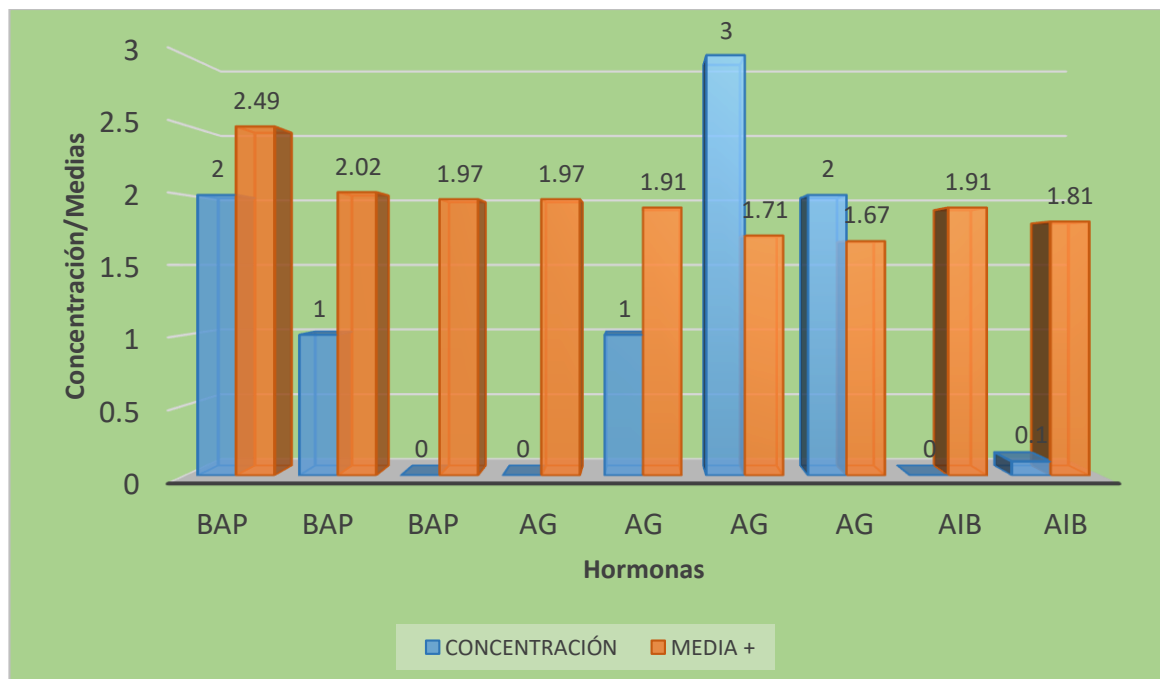
Fuente: El autor

CUADRO X. ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA DETERMINAR LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN HORMONA X CONCENTRACIÓN EN LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS EN ESTABLECIMIENTO.

HORMONA	CONCENTRACIÓN	MEDIA +	AGRUPAMIENTO LSD
BAP	2	2.49	a
BAP	1	2.02	b
BAP	0	1.97	b
AG	0	1.97	a
AG	1	1.91	a
AG	3	1.71	b
AG	2	1.67	b
AIB	0	1.91	a
AIB	0.1	1.81	a

Fuente: El autor

+: Medias de mínimos cuadrados.



GRÁFICA 2: Medias de Mínimos cuadrados para la interacción hormona x concentración para la variable número de hojas en Establecimiento.

Fuente: El autor

4.2.3 Número de yemas

En el caso de esta variable no se observó interacción significativa entre hormona y concentración. Esto indica que sus efectos son independientes uno del otro. Al analizar los efectos principales se observó que tanto hormona como concentración tuvieron un efecto altamente significativo ($P < 0.01$). Esto ameritó comparar las medias de las hormonas y también las medias de las concentraciones para la variable en estudio. (Cuadro XI).

CUADRO XI. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	2	14.28	0.0001**
Concentración	4	54.51	0.0001**
Hormona*Concentración	2	0.36	0.6997 NS
Error	156		
Total	164		

C.V= 31.92%

****:** Diferencia altamente significativa.

NS: No significativo.

Fuente: El autor

CUADRO XII. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS HORMONAS PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

HORMONAS	MEDIAS	AGRUPACIÓN TUKEY+	
BAP - AIB	0.47	***	a
AG - AIB	0.29	***	b
BAP - AG	0.18	***	b

Fuente: El autor

*****: Diferencia altamente significativa a 0.01**

+: Medias seguidas por la misma letra no difieren según la prueba de Tukey.

La prueba de Tukey como se observa en el cuadro, indica que la Hormona BAP (Bencilaminopurina) frente a la hormona AIB tuvo el número de yemas promedio más alto la cual fue superior a las hormonas AG (Ácido Giberélico) frente a AIB y BAP frente a la hormona AG.

CUADRO XIII. COMPARACION DE MEDIAS DE CONCENTRACIÓN PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

CONCENTRACIÓN	MEDIA	AGRUPAMIENTO TUKEY	
2 - 0	1.27	***	a
2 - 0.1	0.81	***	b
2 - 3	0.58	***	b
2 - 1	0.33	***	b
1 - 0	0.93	***	a
1 - 0.1	0.47	***	a
1 - 3	0.24		b
3 - 0	0.69	***	a
3 - 0.1	0.23		b
0.1 - 0	0.45	***	a

Fuente: El autor

*****: Diferencia altamente significativa a 0.01**

La prueba de Tukey como se observa en el cuadro, indica que la concentración 2 ppm frente a las demás concentraciones alcanzó las medias más altas.

4.3 Etapa de Multiplicación

4.3.1 Brotes por explante

El análisis de varianza (ANOVA) para esta variable determinó una interacción Hormona x Concentración altamente significativa ($P < 0.01$), esto nos indica que los efectos de Hormonas y Concentración están relacionados. Debido a esto se procedió a analizar la matriz de valores P generados por SAS con el objetivo de encontrar la naturaleza de esta interacción. (Cuadro XIV)

CUADRO XIV. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE BROTES EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	88.06	0.0001**
Concentración	3	13.84	0.0001**
Hormona*Concentración	2	8.92	0.0002**
Error	130		
Total	136		

C.V= 29.25%

****:** Diferencia altamente significativa 1%

Fuente: El autor

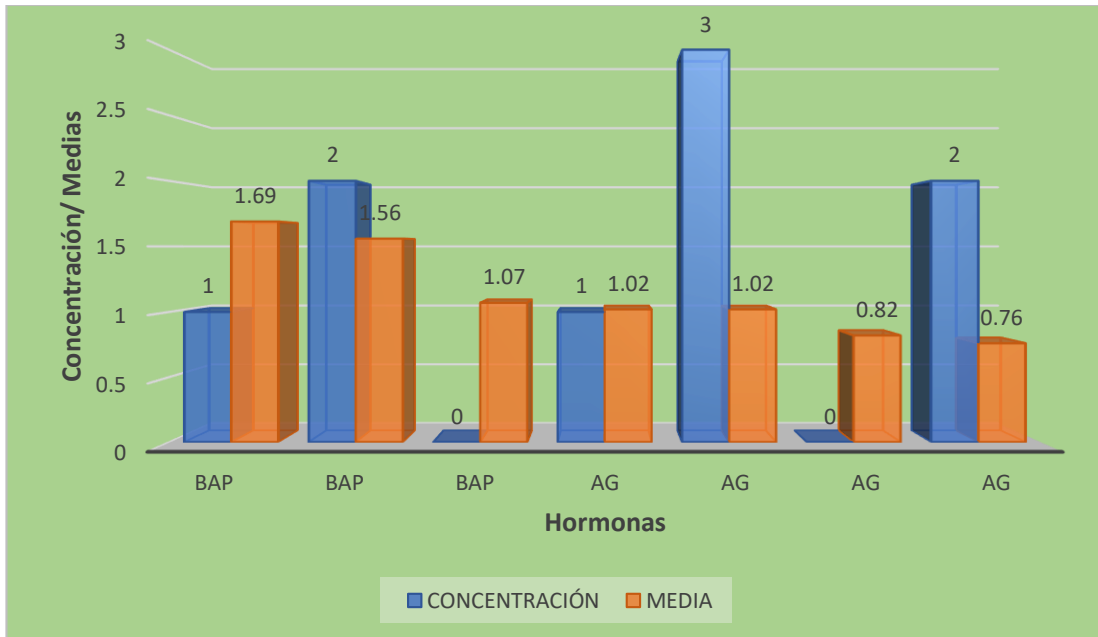
CUADRO XV. ANÁLISIS DE MATRIZ DE VALORES P PARA DETERMINAR LA NATURALEZA DE LA INTERACCION EN LA VARIABLE BROTE POR EXPLANTE EN ETAPA DE MULTIPLICACION.

HORMONA	CONCENTRACIÓN	MEDIA+	AGRUPAMIENTO LSD
BAP	1	1.69	a
BAP	2	1.56	a
BAP	0	1.07	b
AG	1	1.02	a
AG	3	1.02	a
AG	0	0.82	b
AG	2	0.76	b

Fuente: El autor

+: Medias de mínimos cuadrados

Según los resultados de la matriz de valores P se observa que las medias del tratamiento BAP (0, 1, 2) presentaron los mejores resultados con los brotes medios por explante más alto.



Gráfica 3: Medias de mínimos cuadrados para la interacción hormona x concentración para la variable brote por explante en la etapa de Multiplicación.

Fuente: El autor

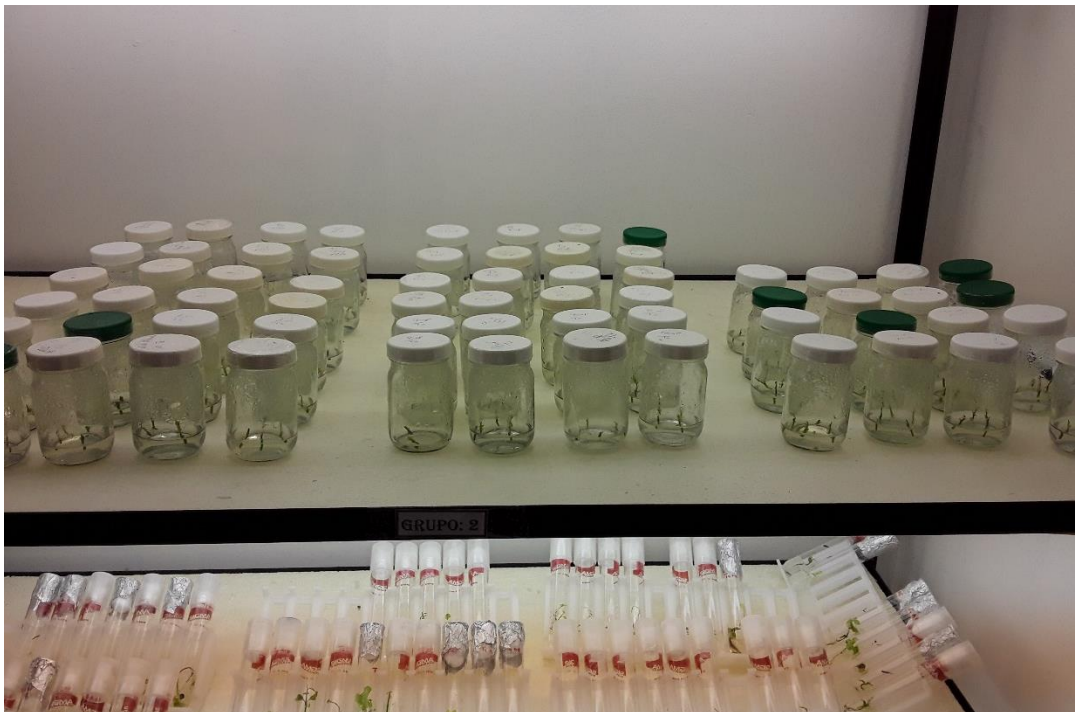


FIGURA 7: Etapa de Multiplicación

Fuente: El autor

4.3.2 Número de Yemas

En el caso de esta variable no se observó interacción significativa entre hormona y concentración lo que indica que sus efectos son independientes uno del otro. Al analizar los efectos principales se observó que tanto hormonas como concentración tuvieron un efecto altamente significativo ($P < 0.01$). Esto llevó a comparar las medias de hormona y concentración para la variable en estudio. (Cuadro XVI)

CUADRO XVI. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	21.61	0.0001**
Concentración	3	23.65	0.0001**
Hormona*Concentración	2	1.88	0.1563 NS
Error	130		
Total	136		

C.V= 35.52%

NS: No significativo

**** : Diferencia altamente significativa al 1%.**

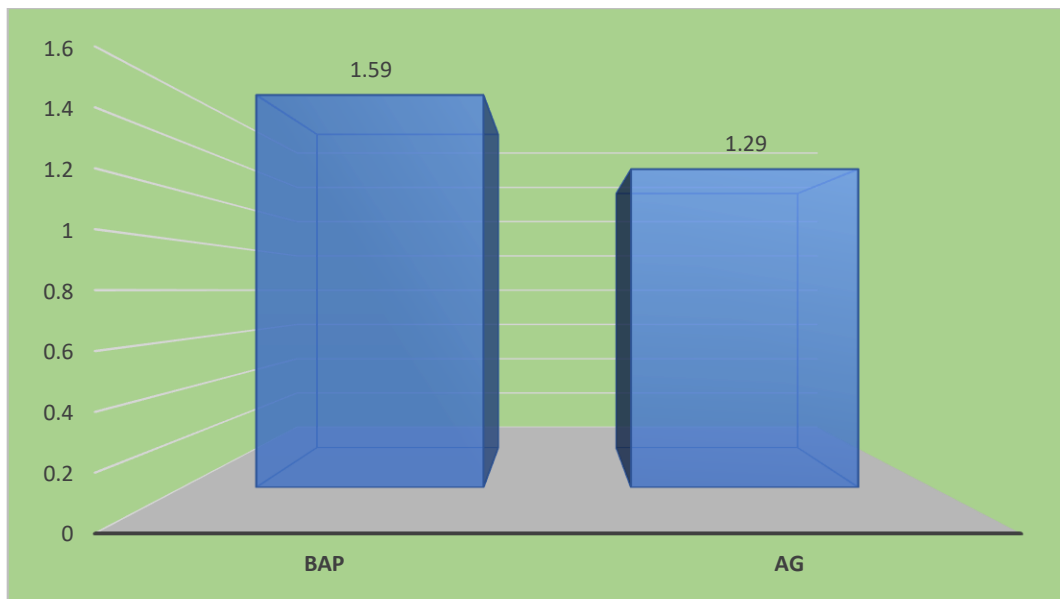
Fuente: El autor

CUADRO XVII. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE HORMONA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN LA ETAPA DE MULTIPLICACION.

HORMONA	MEDIA	AGRUPAMIENTO TUKEY
BAP	1.59	a
AG	1.29	b

Fuente: El autor

Los resultados obtenidos para esta variable según la prueba de Tukey, muestra que hay diferencia entre los efectos principales de las hormonas, siendo BAP (Bencilaminopurina) la hormona con la que se alcanzó la media más alta, siendo esta de 1.59, mientras que el AG (Ácido Giberélico) presentó una media más baja siendo esta de 1.29.



Gráfica 4: Número de yemas por explante en Multiplicación

Fuente: El autor

CUADRO XVIII. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CONCENTRACIÓN PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

CONCENTRACIÓN	MEDIA	AGRUPAMIENTO TUKEY	
1 - 0	0.79	***	a
1 - 2	0.30		b
1 - 3	0.20		b
2 - 0	0.49	***	a
3 - 0	0.59	***	a
3 - 2	0.09		b

Fuente: El autor

*****: Altamente significativas a 0.01**

La prueba de Tukey como se observa en el cuadro, indica que la aplicación de reguladores de crecimiento tuvo un efecto significativo con respecto a la no aplicación de reguladores.

4.3.3 Longitud de brotes

En el caso de esta variable no se observó interacción significativa entre hormona y concentración, lo que indica que sus efectos son independientes. Al analizar los efectos principales se observó que Hormona no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$). Sin embargo, el efecto de concentración fue significativo. Esto llevó a comparar las medias de las concentraciones con la prueba de Tukey. (Cuadro XIX)

CUADRO XIX. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	1.87	0.1740NS
Concentración	3	4.12	0.0079 *
Hormona*Concentración	2	1.38	0.2541NS
Error	130		
Total	136		

NS: No significativo

***: Diferencia significativa al 5%**

Fuente: El autor

CUADRO XX. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CONCENTRACIONES PARA LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

CONCENTRACIÓN	MEDIA	AGRUPAMIENTO TUKEY	
3 - 0	0.44	***	a
3 - 2	0.26		b
3 - 1	0.13		c
2 - 0	0.17		a
1 - 0	0.31		a
1 - 2	0.13		a

Fuente: El autor

*****: comparaciones significativas a 0.05**

Los resultados obtenidos para esta variable en la prueba de Tukey, indica que la mejor respuesta se presentó con la concentración 3 ppm, siendo la media más alta de 0.44 frente a los tratamientos donde no se aplicó reguladores de crecimiento.

4.4 Primer subcultivo

4.4.1 Brotes por explante

En cuanto a esta variable el análisis de varianza reveló una interacción Hormona x Concentración altamente significativa ($P < 0.01$). Esto quiere decir que los efectos de Hormona y concentración están relacionados. Debido a esto se analizó la matriz de valores P generados por SAS con el fin de determinar la naturaleza de esta interacción. (Cuadro XXI)

CUADRO XXI. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE BROTES POR EXPLANTE EN EL PRIMER SUBCULTIVO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	24.67	0.0001**
Concentración	3	7.79	0.0001**
Hormona*Concentración	2	8.33	0.0005**
Error	93		
Total	99		

C.V= 21.37

****:** Diferencia altamente significativa 1%.

Fuente: El autor

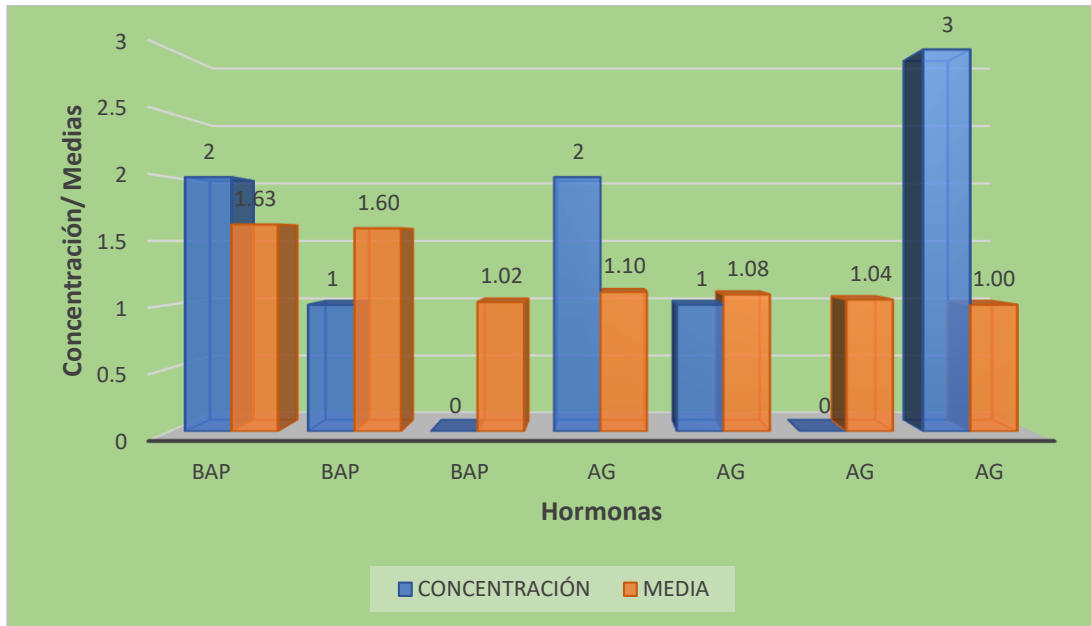
CUADRO XXII. ANÁLISIS DE LA MATRIZ DE VALORES P PARA DETERMINAR LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN HORMONA X CONCENTRACIÓN PARA LA VARIABLE EN ESTUDIO.

HORMONA	CONCENTRACIÓN	MEDIA+	AGRUPAMIENTO LSD
BAP	2	1.63	a
BAP	1	1.60	a
BAP	0	1.02	b
AG	2	1.10	a
AG	1	1.08	a
AG	0	1.04	a
AG	3	1.00	a

Fuente: El autor

+: Medias de Mínimos Cuadrados

Según los resultados obtenidos al analizar la matriz de valores P para esta variable se observó que los tratamientos BAP (1, 2) alcanzaron el número de brotes medio más alto teniendo un comportamiento similar, en cambio los demás tratamientos alcanzaron medias más bajas y no difieren entre sí.



Gráfica 5: Medias de Mínimos cuadrados para la interacción hormona x concentración en la variable brotes por explante en el primer subcultivo.

Fuente: El autor

4.4.2 Número de yemas

El análisis de varianza reveló que existe interacción Hormona x Concentración significativa. Esto indica que los efectos de hormona y concentración están relacionados entre sí. Por este motivo se analizó la matriz de valores P generados por SAS con el fin de determinar la naturaleza de esta interacción. (Cuadro XXIII)

CUADRO XXIII. RESULTADO DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NUMERO DE YEMAS EN EL PRIMER SUBCULTIVO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	1.71	0.1938 NS
Concentración	3	8.12	0.0001**
Hormona*Concentración	2	3.22	0.0445*
Error	93		
Total	99		

C.V= 23.13%

****:** Diferencia altamente significativa al 1%.

***:** Diferencia significativa al 5%.

Fuente: El autor

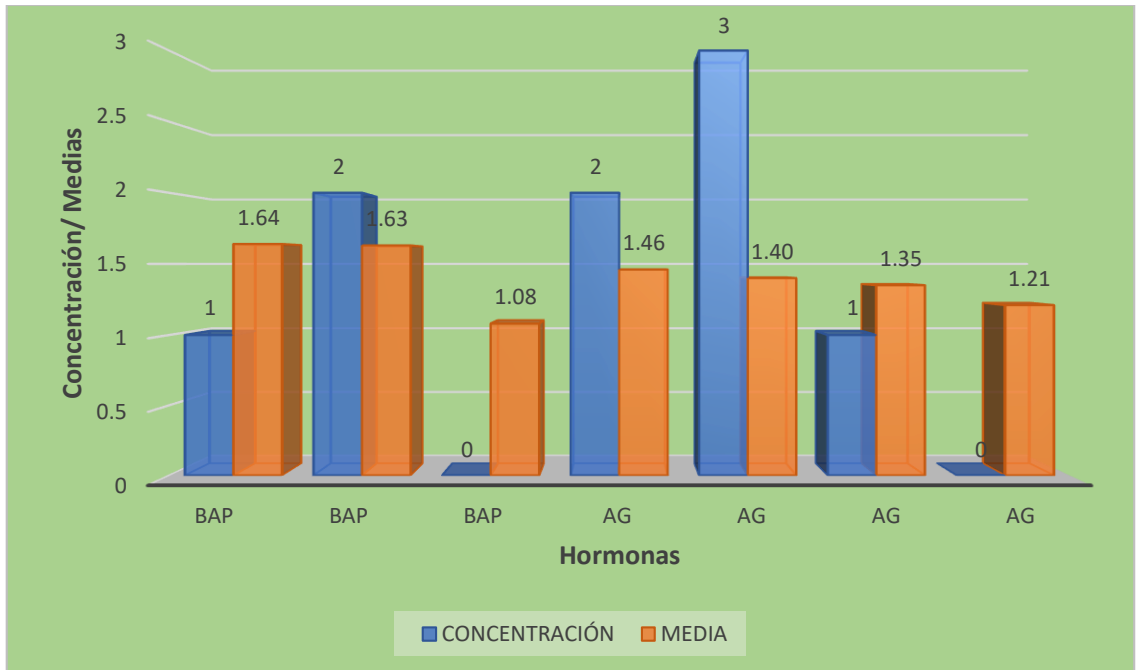
CUADRO XXIV. ANÁLISIS DE LA MATRIZ DE VALORES P PARA DETERMINAR LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN HORMONA X CONCENTRACIÓN EN LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN EL PRIMER SUBCULTIVO.

HORMONA	CONCENTRACIÓN	MEDIA+	AGRUPAMIENTO LSD
AG	0	1.21	a
AG	1	1.35	a
AG	2	1.46	a
AG	3	1.40	a
BAP	0	1.08	a
BAP	1	1.64	b
BAP	2	1.63	b

Fuente: El autor

+: Medias de mínimos cuadrados

Según los resultados obtenidos al analizar la matriz de valores P para esta variable se observó que los tratamientos BAP (1, 2) alcanzaron el número de yemas medio más alto teniendo un comportamiento similar, en cambio los demás tratamientos alcanzaron medias más bajas y no difieren entre sí.



Gráfica 6: Medias de mínimos cuadrados para la interacción hormona x concentración en la variable número de yemas en el primer subcultivo.

Fuente: El autor

4.4.3 Longitud de brotes

En el caso de esta variable se encontró que ni la interacción ni los efectos principales fueron significativos. Esto lleva a pensar que los factores no están relacionados, sino que, actúan independientemente; pero de todas formas actuando de forma independiente no tuvieron impacto en la variable medida.

CUADRO XXV. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE LONGITUD EN EL PRIMER SUBCULTIVO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	0.68	0.4115 NS
Concentración	3	1.58	0.1983 NS
Hormona*Concentración	2	0.4	0.6712 NS
Error	93		
Total	99		

C.V= 28.64%

NS: No significativo.

Fuente: El autor

4.5 Segundo Subcultivo

4.5.1 Brotes por explante

Para esta variable, no se encontró interacción y los efectos principales de Hormona y Concentración no tuvieron un efecto significativo ($P > 0.05$). Esto significa que los factores no están relacionados, sino que, actúan independientemente, pero aun así no tuvieron impacto en la variable medida.

CUADRO XXVI. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE BROTES EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	2.85	0.0971 NS
Concentración	2	0.89	0.4156 NS
Hormona*Concentración	0		
Error	54		
Total	57		

C.V= 39.90%

NS: No significativo

Fuente: El autor

4.5.2 Número de yemas

En el caso de esta variable no se observó interacción entre hormona y concentración. Al analizar los efectos principales se observó que el factor concentración no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$). Sin embargo, el efecto del factor Hormona fue altamente significativo ($P < 0.01$). Esto ameritó comparar las medias de las hormonas con la prueba de Tukey.

CUADRO XXVII. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	10.60	0.0020**
Concentración	2	1.33	0.2729 NS
Hormona*Concentración	0		
Error	54		
Total	57		

C.V= 29.21%

NS: No significativo.

** : Diferencia altamente significativa al 1%.

Fuente: El autor

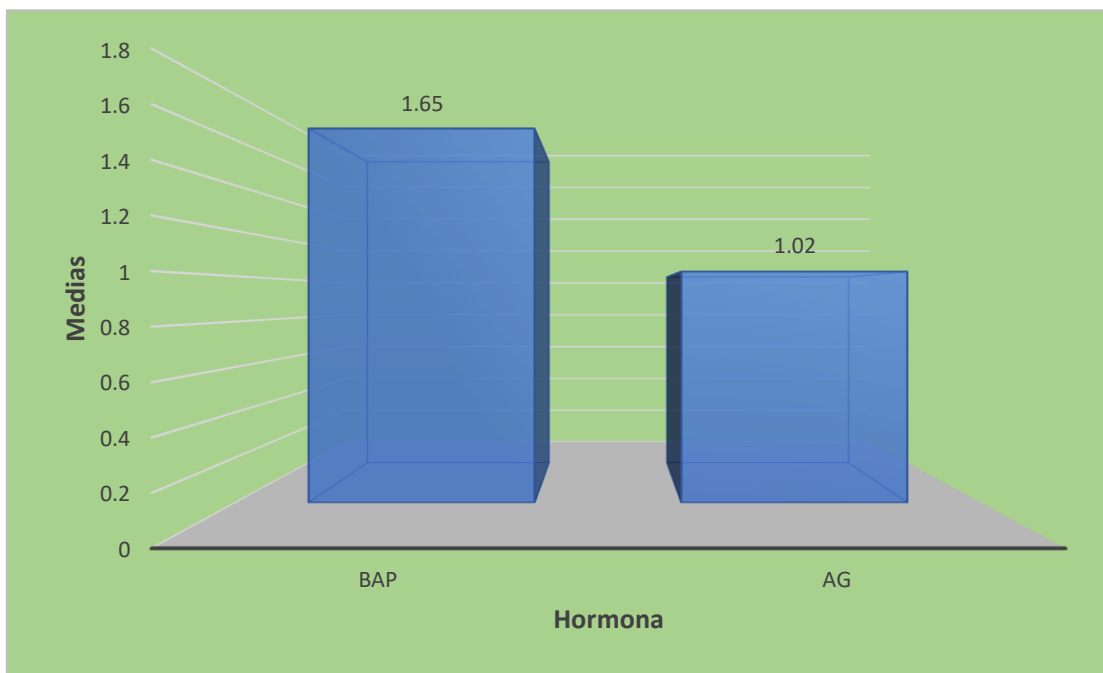
CUADRO XXVIII. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS HORMONAS PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.

HORMONA	MEDIA	AGRUPAMIENTO TUKEY +
BAP	1.65	a
AG	1.02	b

Fuente: El autor.

+: Medias seguidas por la misma letra no difieren según la prueba de Tukey.

La prueba Tukey como se ilustra en el cuadro indicó que la hormona BAP (Bencilaminopurina) tuvo el número de yemas promedio más alto, el cual fue significativamente superior a la hormona AG (Ácido Giberélico).



Gráfica 7: Promedio de número de yemas en el segundo subcultivo.

Fuente: El autor

4.5.3 Longitud de brotes

En cuanto a esta variable, el análisis de varianza no encontró interacción entre Hormona y Concentración y los efectos principales no tuvieron un efecto significativo ($P > 0.05$). Esto significa que los factores no están relacionados, sino que actúan independientemente, pero aun así no tuvieron impacto en la variable medida.

CUADRO XXIX. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE LONGITUD EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO.

TABLA ANOVA

F.V	GL	Fc	Pr > F
Hormona	1	0.07	0.7914 NS
Concentración	2	0.21	0.8124 NS
Hormona*Concentración	0		
Error	54		
Total	57		

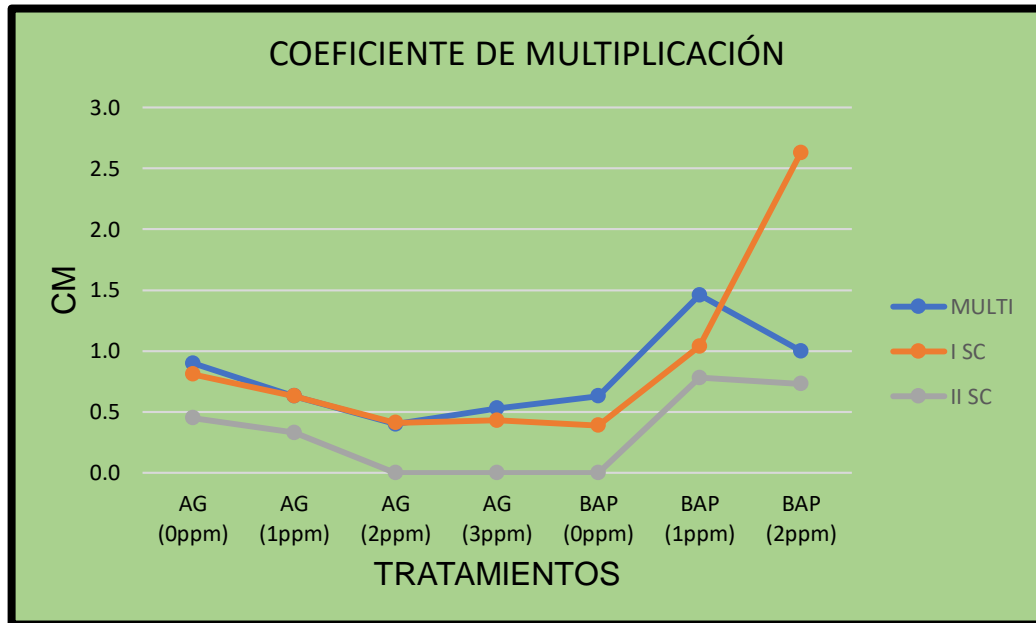
NS: No significativo.
Fuente: EL autor

CUADRO XXX. COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN DE *Swinglea glutinosa* OBTENIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO DE MULTIPLICACIÓN

Coeficiente de Multiplicación de <i>Swinglea glutinosa</i>							
TRATAMIENTOS							
Hormona/Conc	AG (0ppm)	AG (1ppm)	AG (2ppm)	AG (3ppm)	BAP (0ppm)	BAP (1ppm)	BAP (2ppm)
EXPLANTES INICIALES	30	30	30	30	60	30	30
MULTIPLICACIÓN	27(0.9)	19(0.63)	12(0.4)	16(0.53)	38(0.63)	44(1.46)	30(1.0)
I SUBCULTIVO	22(0.81)	12(0.63)	5(0.41)	7(0.43)	15(0.39)	46(1.04)	79(2.63)
II SUBCULTIVO	10(0.45)	4(0.33)	0(0)	0(0)	0(0)	36(0.78)	58(0.73)

Nota: Entre paréntesis el factor de multiplicación

Fuente: El autor



Gráfica 8: Coeficiente de multiplicación

Multi: multiplicación

ISC: Primer Subcultivo

II SC: Segundo subcultivo

5. CONCLUSIONES

- ❖ Para lograr una desinfección eficaz de las semillas de limoncillo se debe sumergir las semillas durante 30 minutos en la solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) 1.25%.
- ❖ La aplicación de AG (Ácido Giberélico) a una concentración de 1 ppm ayuda a obtener plántulas de mayor altura en la etapa de Establecimiento.
- ❖ La aplicación de BAP (Bencilaminopurina) estimuló la mayor producción de hojas y yemas por planta en la etapa de establecimiento.
- ❖ En la etapa de Multiplicación la aplicación de BAP (Bencilaminopurina) a 1 ppm logra producir la mayor cantidad de brotes por explante y número de yemas.
- ❖ La mayor tasa de producción de brotes se alcanzó en el segundo subcultivo con la aplicación de BAP (Bencilaminopurina) a una concentración de 2 ppm adicionados al medio Murashige y Skoog.

6. RECOMENDACIONES

- ❖ Para el establecimiento *in vitro* de Limoncillo se recomienda la utilización de semillas gámicas y que su posterior tratamiento se de en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones.

- ❖ Por lo general la presencia de Antioxidantes es muy importante en la etapa inicial de la micropropagación, en este caso no se aplicó ningún antioxidante y no se presentó oxidación en los explantes. Por lo que se recomienda no aplicar antioxidantes.

- ❖ Continuar investigando sobre un protocolo más preciso en la micropropagación de limoncillo en donde se logren aumentar el número de brotes a partir del segundo subcultivo.

- ❖ Realizar ensayos sobre diferentes combinaciones de reguladores de crecimientos para la producción de raíces de limoncillo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Budowsky, G; Russo, R. 1993. Live Fence Posts in Costa Rica: a compilation of the farmer's beliefs and technologies. *Journal of Sustainable Agriculture*.

CIAT. (s.f.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. (W. Roca, & L. Mrogingski, Edits.) Recuperado el 24 de Julio de 2019

Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. (s.f.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Recuperado el 11 de Febrero de 2019, de http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf

Contreras, C. (2016). *Manual de Prácticas Biotecnología*. Preparación de Medios de Cultivo , México. Recuperado el 24 de Julio de 2019, de <http://ri.uaemex.mx>

Contreras, R. (8 de Marzo de 2013). *Biología*. Recuperado el 2 de Febrero de 2018, de biologia.laguia2000.com

García, G. (Febrero de 2011). *FAO*. (A. Gálvez, R. López, & W. Gámez, Edits.) Recuperado el 2 de Julio de 2018, de <http://coin.fao.org>

Institución Educativa Presbítero Daniel Jordan. (25 de Febrero de 2006). *Blogger.com*. Recuperado el 12 de Abril de 2019, de <http://limonswinglecoldajo.blogspot.com/>

Morfología de Plantas Vasculares. (s.f.). Recuperado el 2 de Febrero de 2019, de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema10/10-7difcelular.htm>

Segovia, R.; R. Sedano; G. Reina; G. López y A. van Schoonhoven. 2000. Árboles, arbustos y aves en el agroecosistema del CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

University of California Riverside. (s.f.). *Citrus Variety*. Recuperado el Junio de Agosto de 2019, de <https://citrusvariety.ucr.edu>