

## **CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN**

### **1.1. ANTECEDENTES**

Los cítricos son el cultivo frutal de mayor importancia económica en el mundo, la producción mundial que fue proyectada para el 2010 fue de 100.000 millones de toneladas lo que representa la cuarta parte de toda la producción frutícola FAO (2007).

Dentro del contexto mundial más de 100 países producen cítricos, siendo España el primer exportador cítrico del Mundo. Es número uno en naranjas, mandarinas y limones. Podemos decir que 1 de cada 4 cítricos que se exportan en el mundo son españoles. Las mandarinas han sido apreciadas por su característico fino y dulce sabor, sin embargo, es su facilidad de pelado, la característica más común y renombrada.

La mandarina tiene un amplio rango de adaptabilidad y se cultiva tanto en zonas subtropicales como tropicales. A pesar de ello, las distintas variedades de mandarinas son muy específicas en sus requerimientos climáticos para la producción de frutas de buena calidad.

Las variedades que destacan dentro de este grupo a nivel mundial son Fina Clemenules, Oroval, Marisol, Oronules, Esbal, Clemenpons, Loretina y Hernandina. Entre otras variedades se destaca la mandarina Cleopatra más conocida como criollita.

En Tarija esta variedad se cultiva en zonas subtropicales en el chaco tarijeño y templado en el valle central, se consultó con algunos productores del chaco que hace varios años esta variedad era la más destacada por el tamaño, dulzor y color del fruto, cuyas plantas a consecuencia de enfermedades como la (gomosis), se fueron

perdiendo y las pocas plantas que quedan producen frutos de menor calidad y con muy bajos rendimientos.

Dadas estas circunstancias, en los últimos años la producción de mandarina de esta variedad no cubre los requerimientos de la población consumidora, por lo que instituciones como el SEDAG (Servicio Departamental Agropecuario), regional Entre Ríos, con la finalidad de ampliar la superficie con plantaciones de esta especie, viene multiplicando esta variedad a través de la técnica de propagación sexual (por semilla botánica) con el riesgo de que las plantas producidas no sean de la calidad esperada, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas para la multiplicación de plantas más resistentes y longevas y que produzcan frutos de mejor calidad.

La micropropagación o cultivo *in vitro* es un conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades. La micropropagación se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas y libres de enfermedades.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

Existe una elevada demanda de plantines de cítricos injertados en porta injertos resistentes a la *Phytophthora*, la multiplicación de estos patrones se la realiza por semilla, presentando una variabilidad en el material genético obtenido.

El presente trabajo de investigación de producción de patrones *in vitro*, se presenta como una alternativa para la producción de porta injertos, tomando en cuenta la gran demanda que se tiene en el mercado de plantas injertadas en porta injertos de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex. Tanaka*), por lo que se probará el uso de embriones nucelares y segmentos nodales para la micropropagación de esta especie.

De esta manera aportar a mejorar la producción nacional y departamental ya que se presentan problemas de producción a causa del hongo (*Phytophthora ssp*).

### **1.3 PROBLEMA**

Uno de los factores que afecta la producción de cítricos son las enfermedades, especialmente las causadas por el pseudo hongo (*Phytophthora ssp*), la que ha diezmando la producción en diferentes regiones del departamento. Uno de los medios de control de esta enfermedad es el uso de porta injertos resistentes a esta enfermedad, dentro del porta injerto resistentes se encuentra la mandarina cleopatra (*Citrus reshni Hort ex. Tanaká*).

La multiplicación del porta injerto se realiza a través de propagación sexual, donde la variabilidad genética no permite obtener individuos con las características deseadas de las plantas madre.

### **1.4 HIPÓTESIS**

- Mediante explantes provenientes de segmentos nodales se tendrá una mejor regeneración y establecimiento de vitro plantas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni Hort ex. Tanaka*).

### **1.5 OBJETIVOS**

#### **1.5.1 Objetivo General**

Introducción in vitro de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex. Tanaka*) a partir de embriones nucleares y segmentos nodales en diferentes medios de cultivos para la producción de porta injertos, en el Laboratorio de Fitopatología y cultivo in vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales.

### **1.5.2 Objetivos Específicos**

1. Evaluar el efecto de las fitohormonas en el medio de cultivo Murashige Skoog en la fase de Introducción in vitro de la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex. Tanaka*) con segmentos nodales y embriones nucleares.
2. Evaluar la contaminación de los embriones nucleares y los segmentos nodales con el método de desinfección de alcohol al 70% e hipoclorito al 1.5%.

## CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

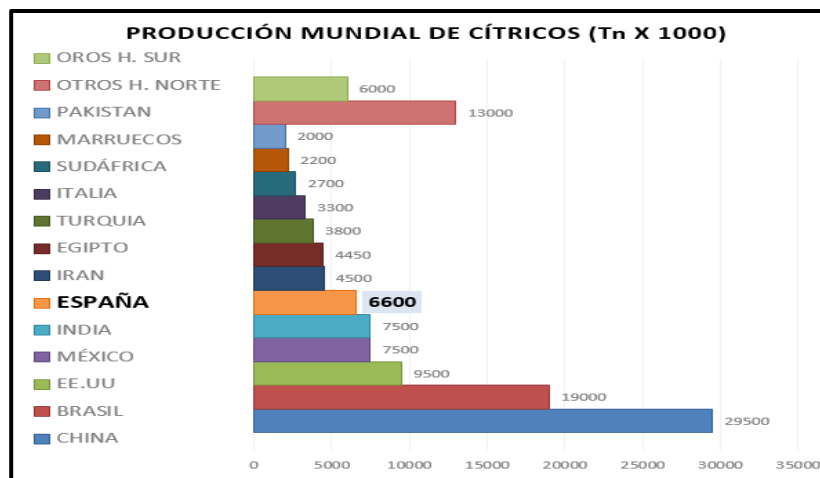
### 2.1 HISTORIA

La citricultura es una rama de la fruticultura que estudia el cultivo y las características de un grupo de plantas llamadas cítricos. Esta denominación se debe a la mayoritaria inclusión de género *Citrus* de los frutales comprendidos en este grupo, aunque incluya algunas especies de escasa importancia de género *fortunella* y al *poncirus trifoliata*. En inglés el término *Citrus* ha sido acuñado con carácter común para designar estas especies cuyo cultivo recibe el nombre de citrus industry. (Agusti, 2016)

Los cítricos son una de las especies arbóreas más cultivadas en todo el mundo. Sus deliciosos frutos son la causa de su gran éxito y, por ello, llevan siendo cultivados desde hace 4.000 años. Las numerosas especies de cítricos se desarrollan en casi todas las regiones del mundo dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud. (Agusti, 2016)

#### 2.1.1 Importancia económica y distribución geográfica.

**Figura N° 1 Producción mundial de cítricos**



El primer productor de cítricos a nivel mundial es China, seguido de Brasil y EE.UU. España es el 6º productor del mundo con el 5 % de la producción. Es el 6º productor de naranjas, el 2º productor de mandarinas y el 4º productor de limón a nivel mundial. (Agusti, 2016).

**Figura N º2 Exportación mundial de cítricos**



Siendo el 6º productor mundial, España es el primer exportador cítrico del Mundo. Es número uno en naranjas, mandarinas y limones. Podemos decir que 1 de cada 4 cítricos que se exportan en el mundo son españoles. Sus principales clientes son europeos (Alemania, Francia, Italia, UK, Países Bajos...). En cuanto al resto del mundo destacan las exportaciones a Canadá y Estados Unidos.

En áreas semitropicales (23-24° a 30° latitud N y S) los frutos tienen unas características intermedias: son muy jugosos, con un elevado contenido en azúcares y pueden ser destinados tanto al consumo en fresco como a la elaboración de zumo. Actualmente los cítricos son los frutos de mayor producción en el mundo. (Agusti, 2016).

### **2.1.2 Importancia de la utilización y elección de patrones en la citricultura**

La aparición de plagas y enfermedades ha obligado a realizar cambios importantes en la citricultura, fundamentalmente en la utilización de patrones resistentes y tolerantes. La muerte causada por *Phytophthora* hacia mediados del siglo XIX estuvo a punto de causar la desaparición del cultivo, solo cuando se sustituyeron los patrones empleados por la naranja agria (*Citrus aurantium L*)

La aparición del virus de la tristeza en los cítricos CTV, al cual es susceptible la naranja agria, utilizada como patrón para naranjas mandarinas pomelos, limones y limas acidas, causó la muerte de más de tres millones de árboles en Argentina. Por este motivo se cambió por otros patrones que presentaban resistencia, como la mandarina Cleopatra, o los del género *Poncirus*. (VASQUEZ ,2013)

Las hibridaciones obtenidas entre *Poncirus trifoliata* y especies del género *Citrus* originaron: los citranges, las citrandarinas, citrumelos y otros trifoliados. Se renovaron patrones que además de presentar tolerancia al virus de la tristeza, influyen en la calidad de la fruta, en la tolerancia a condiciones adversas y en la adaptación a condiciones climáticas.

La elección del patrón adecuado es trascendental para obtener altos rendimientos y una mayor supervivencia, en condiciones abióticas y bióticas adversas. Se pueden obtener combinaciones compatibles entre el patrón y la variedad injertada (VASQUEZ ,2013)

## **2.2 ORIGEN DE LA MANDARINA**

La mandarina probablemente fue cultivada en China desde hace varios miles de años, y la primera referencia a esta fruta se remonta al siglo 12 AC. De su región de origen, la mandarina se propagó en la mayor parte del sudeste de Asia, y en otras partes de la India. Por el siglo X la mandarina se cultiva extensamente en las prefecturas del sur de Japón. (Emprendices, 2011)

La mandarina proviene de las zonas tropicales de Asia. Se cree que su nombre se debe al color de los trajes que utilizaban los mandarines, gobernantes de la antigua China. Se puede afirmar que es una fruta originaria de China e Indochina. Su cultivo se introdujo en Europa en el siglo XIX. En la Comunidad Valenciana se produce el 90% de la mandarina de España. (Emprendices, 2011).

## **2.3 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA**

### **2.3.1 Planta**

La mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) es una planta cítrica muy utilizada en agricultura como porta injerto, actualmente recomendado para naranjas y mandarinas en general. También se puede injertar con limoneros. La mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) es un porta injerto resistente a la caliza del suelo, tolerante a la tristeza y exocortis (Cítricas, 2017).



### 2.3.2 Descripción botánica

#### TAXONOMIA

Reino:	<b>Vegetal.</b>
División:	Tracheophytae.
Sub División:	Anthophyta.
Phylum:	Telemophytae.
Clase:	Angiospermae.
Sub Clase:	Dicotyledoneae
Grado Evolutivo:	Archichlamydeae
Grupo de Ordenes:	Corolinos
Orden:	Geraniales
Familia:	Rutaceae
Nombre científico:	Citrus reshni Hort. ex Tanaka.
Nombre común:	Mandarina cleopatra

**Fuente:** Herbario Universitario, 2017.

### 2.3.3 Etimología del nombre

En el 1828 se desarrolló la etimología del nombre cuando el fruto hizo su aparición en el mar mediterráneo, se llamó mandarina a causa de su origen que se supuso china. Todos supieron que en China las máximas autoridades fueron precisamente los "mandarinos", por tanto, pareció justo dar igualmente el mismo nombre a estos nuevos frutos aristócratas e igualmente... pálidos en comparación de las naranjas sus hermanas. El apelativo gracioso e irreverente no tardó a convertirse en la denominación oficial. (Signore, 2010).

## **EL FRUTO**

Las características que comparten casi todas las mandarinas son su temporada de cosecha relativamente corta y su susceptibilidad al deterioro durante la recolección, embalaje y transporte al mercado. La corteza es más frágil y sensible a enfermedades con tendencia a hincharse, mientras que internamente la carne pierde acidez y jugo y se convierte en insípido en el árbol por un tiempo relativamente corto después de llegar a la madurez máxima. Sin embargo, si se manejan con cuidado, las mandarinas pueden ser almacenadas correctamente durante varias semanas o más. (Emprendices, 2011).

### **2.5 ADAPTACIÓN CLIMÁTICA DE LA MANDARINA**

Los árboles de mandarinas y sus híbridos son generalmente los más resistentes al frío de todos los cítricos cultivados comercialmente, sin embargo, los frutos de mandarina sufren más daño que la mayoría de las naranjas y pomelos.

La variedad más exigente de mandarinas en sus requerimientos climáticos es probablemente la Clementina, la cual todavía tiene una muy restringida distribución, limitada casi exclusivamente a las zonas costeras de Marruecos, España, Córcega y en el pasado reciente a Sudáfrica, Argentina, Uruguay y Chile.

Las mandarinas mediterráneas mediante sus variedades híbridas tienden a alternar a luz, cuando las cosechas grandes de fruta muy pequeña son seguidas por cultivos de la luz de frutos grandes, de baja calidad. A menudo, las otras variedades se recomiendan como polinizadoras para fomentar un mejor cuajado de los frutos, mientras que varias prácticas agrícolas tales como anillamiento de los tallos, la fumigación con regulador del crecimiento y la mano de adelgazamiento, se emplean para influir en el comportamiento de un desarrollo irregular. (Anacafé, 2013)

## 2.6 PROPAGACIÓN DE LA MANDARINA

La propagación de la mandarina es asexual y mediante injerto de escudete a yema. Si se precisa de reinjertado para cambiar la variedad, se puede hacer el injerto de chapa que también da muy buenos resultados. Mientras que todas las especies se puede micropropagar, pero en ambos casos solamente se utilizaran como plantas madre para posteriores injertos. (Emprendices, 2011)

### 2.6.1 Mandarina cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaká*)

Es un patrón adaptable a un variado tipo de suelos, desde los arenosos profundos hasta los bajos y húmedos, pero no inundados. Sin embargo, en arenas muy ligeras la cosecha obtenida con muchas de las variedades comerciales es baja, tanto en cantidad como en tamaño de frutos. Las plantas florecen normalmente pero no mantienen los frutos formados. Los frutos tienen forma oblada de color rojo anaranjado, el número de semilla es elevado con un promedio de 20 por fruto.

Las plantas injertadas sobre mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) son más lentas en iniciar la producción y alcanzar el máximo de cosecha que aquellas plantas injertadas en patrones tales como el limón rugoso o naranjo dulce; esta lentitud puede ser separada en cierto modo por, programas de fertilización adecuados y riesgos apropiadamente distribuidos (MORIN L., 1980).

Consideran a la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) como un buen patrón, bajo variadas condiciones especialmente para mandarinas y naranjas dulces, cuando el limón sutil se injerta sobre este porta injerto, se observa una pobre unión en la zona del injerto, una baja producción y el tamaño de los frutos es pequeño (MORIN L., 1980).

Es un patrón tolerante a la salinidad. Su tolerancia a suelos calcáreos varía de regular a buena, mientras que la acumulación de boro en plantas injertadas sobre él, es similar a aquella alcanzada sobre el limón rugoso.

Las variedades injertadas sobre mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) son tolerantes a tristeza, *xyloporosis* y *exocortis*, pero susceptibles *apsorosis*.

La mayoría de las variedades comerciales injertadas sobre Cleopatra son plantas medianamente vigorosas, grandes pero muy poco precoces en la producción de fruta. Comparado con otro porta injerto, sobrevive mejores condiciones de suelos más pesados y arcillosos dando mayor producción. También tiene más tolerancia a suelos salinos. Produce fruta de alta calidad interna y externa, pero generalmente de tamaño chico. Es tolerante a enfermedades como tristeza, psorosis, exocortis y cachexia (MORINL., 1980)

### **2.6.2 Porta injertos**

Las plantas cítricas son propagadas sobre un pie o porta injerto. Una porta injerto (también denominado patrón o pie) es la planta en que se hace un injerto. En su conjunto el porta injerto y el injerto constituyen un nuevo individuo bímembre, al cual la porta injerto aporta la sección basal que incluye el sistema radical y al menos una porción de tallo, lignificado (tronco) o no. Por su parte el injerto, constituido por una yema o por un pequeño esqueje con varias yemas de otra planta, conformará la copa o parte superior del nuevo ejemplar, con sus ramas, hojas, flores y frutos. De la unión del injerto con la porta injerto se obtiene una planta compuesta de dos secciones provenientes de individuos distintos, que mostrará un comportamiento particular. En efecto, el porta injerto y el injerto mantienen su individualidad, sin que se produzca intercambio o mezcla de información génica; más aún, ambos miembros o secciones pueden ser bastante diferentes entre sí desde el punto de vista genético

Sin embargo, ambos componentes ejercerán una influencia recíproca, modulada a su vez por el ambiente (SORIA, 2011).

### **2.6.2.1 Ventajas de un patrón o porta injerto**

Las ventajas que se obtienen con la utilización de un patrón o porta injerto adecuado son múltiples y entre ellas se puede mencionar las siguientes (AGROECOLÓGICA, 2018):

- Una mejor adaptabilidad a diferentes condiciones de suelo y clima.
- Mayor uniformidad en calidad de fruto y época de producción.
- Precocidad en la producción.
- Proporciona cierto control sobre la calidad y cantidad de la cosecha para una misma variedad.
- Adaptación a problemas físicoquímicos del suelo (salinidad, asfixia radicular, sequía).
  - Tolerancia a plagas y enfermedades (*Tristeza* y *Phytophthora*).

## **2.7 CULTIVO IN VITRO**

La micropropagación consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo in vitro.

El cultivo in vitro es una herramienta para el mejoramiento, ya que se producen 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 estímulos adecuados (EcuRed, 2018).

Así las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticas de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciben.

El cultivo de tejidos vegetales es como una herramienta de la biotecnología vegetal que aísla partes de una planta y las hace crecer en medios de cultivo artificial in vitro en condiciones de asepsia para obtener metabolitos, tejidos, órganos o plantas completas.

In vitro, plantas o partes de una planta cultivada dentro de un contenedor de vidrio del latín in = Adentro, vitro = vidrio).

Totipotencial capacidad de regeneración de una planta entera a partir de una célula o un grupo de células.

Explant: porción de tejido de planta con el que a través de técnicas in vitro se puede regenerar la planta entera.

Desdiferenciación: consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar lugar a las células de tipo meristemático (EcuRed,2018).

### **2.7.1 Características generales del cultivo in vitro**

- Ocupa pequeña superficie.
- Control de las condiciones de cultivo. Ambientales (temperatura, humedad, luz) nutricionales (minerales, otros compuestos).
- Cultivo "aislado" biótica (ausencia de otro organismo) y abióticamente (viento, etc.).
- Alteraciones de las fases de desarrollo (indiferenciación y diferenciación, plantas carentes de sistema radical, etc.

- Posibilita manipulaciones.
  - Necesita de reestablecer equilibrio del explanto (requerimientos exigentes).
- o (Murashige, T. y F. Skoog. 1962)

Nota: las porciones del vegetal que se cultivan in vitro: "explantes" NO son autotróficos (Intagri, 2016).

### **2.7.2 Propagación de tejidos vegetales en cultivo in vitro.**

El cultivo de tejidos consiste en aislar una porción de la planta (explanto) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial de regenerar una planta nueva.

Estas técnicas se realizan en laboratorios en recipientes de vidrio (in vitro), en condiciones de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. (Intagri, 2016).

## **2.8 TÉCNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS.**

- Micropropagación vegetal.
- Regeneración de plantas (embriogénesis y organogénesis).
- Cultivo de meristemas.
- Cultivo de suspensiones de células vegetales.
- Cultivo de protoplastos.
- Cultivo de anteras.
- Cultivo de óvulos y embriones.

(ARANZALES RONDÓN & GUZMÁN, 2011)

## 2.9 MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, de tejidos, protoplastos, anteras, y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micropropagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización.

El cultivo de células, tejidos y órganos de plantas in vitro se realiza en medios de cultivos artificiales, lo cuales proporcionan los nutrientes necesarios que la planta toma en la tierra en su habitat natural y precisamente el éxito de este tipo de cultivo está influenciado grandemente por la naturaleza del medio de cultivo utilizados y otros factores ambientales. (AMAYA L., 2010)

### 2.9.1 Composición del medio de cultivo Murashige Skoog 1962

**TABLA N°1 Composición del medio de cultivo Murashige Skoog 1962**

<b>MACROELEMENTOS</b>	<b>COMPUESTO</b>	<b>(MG/L)</b>
Nitrato de amonio	(NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1,650 mg/1
Cloruro de calcio	(CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	440 mg/1
Sulfato de magnesio	(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	370 mg/1
Fosfato de potasio	(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170 mg/1
Nitrato de potasio	(KNO <sub>3</sub> )	1,900 mg/1
<b>MICROELEMENTOS</b>	<b>COMPUESTO</b>	<b>(MG/L)</b>
Acido bórico	(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2 mg/1
Cloruro de cobalto	(CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	0.025 mg/1
Sulfato cúprico	(CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	0.025 mg/1
Sulfato ferroso	(FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	27.8 mg/1



Sulfato de manganeso	(MnSO <sub>4</sub> ■ 4H <sub>2</sub> O)	22.3 mg/1
Yoduro de potasio	(KI)	0.83 mg/1
Molibdato de sodio	(Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O)	0.25 mg/1
Sulfato de zinc	(ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	8.6 mg/1
Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O		37.2 mg/1
VITAMINAS		(MG/L)
i-Inositol		<b>100 mg/1</b>
Niacina		<b>0.5 mg/1</b>
Piridoxina	HC1	<b>0.5 mg/1</b>
Tiamina	HC1	<b>0.1 mg/1</b>
Glicinas		<b>2 mg/1</b>
Edamina (opcional)		<b>1g/1</b>

**Fuente:** (PROBIOTEK, 2017).

Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos, los cuales están constituidos de:

### 2.9.2 Compuestos inorgánicos

Los nutrientes inorgánicos o minerales usados en el cultivo in vitro son los mismos requeridos normalmente por las plantas. Entre estos tenemos los macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg) y los micronutrientes (Fe, B, Mo, Co, Zn, Cu, i) (Monografías, 2013).

#### 2.9.2.1 Macronutrientes

Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales, debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico de las plantas

Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables Nitrógeno (N), fósforo (F), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). La conservación óptima de cada nutriente para alcanzar la máxima tasa de crecimiento varía considerablemente entre especies y la finalidad del cultivo (AGUIRRE, 2010).

### **2.9.2.2 Micronutrientes**

Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: hierro (fe) manganeso (mn) zinc (zn) boro (b) cobre (cu) y molibdeno (mo). Algunos medios contienen cobalto (co) yodo (i) y cloro (el), aunque no son esenciales para el crecimiento (AGUIRRE, 2010).

### **2.9.3 Compuestos orgánicos**

Constituidos por tres tipos de compuestos:

- Las vitaminas y aminoácidos
- Los carbohidratos
- Sustancias de crecimiento (fitohormonas)
- Agua

El agua es el elemento donde se disuelve todos los componentes del medio de cultivo. Se debe prestar atención a la calidad de agua, ya que constituye el 95% del medio nutritivo; se debe utilizar agua destilada.

Los compuestos orgánicos de los medios de cultivo son: aminoácidos, vitaminas, azúcares, productos orgánicos estimulantes y reguladores de crecimiento (DefiniciónABC,2017).

### **2.9.3.1 Aminoácidos**

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa in vitro. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada (DefiniciónABC, 2017).

### **2.9.3.2 Vitaminas**

Las vitaminas son usadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas al medio de cultivo para estimular los procesos de crecimiento específicos en los tejidos, y no se excluye que la falta de algunas de ellas puede ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

Para Murashige Skoog, las vitaminas esenciales para el crecimiento de células en plantas superiores son:

Tiamina: es considerada la vitamina imprescindible en el cultivo in vitro para un buen crecimiento del cultivo.

Myo -inositol: estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales con fines de propagación. La concentración más utilizada es de 100 mg/l (AGUIRRE,2010).

### **2.9.3.3 Azúcares**

Los tejidos y células cultivadas in vitro son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego resulta indispensable.

La concentración óptima de azúcar en los medios de cultivo varía entre 20-80g/l, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética (AGUIRRE, 2010).

### **2.9.3.4 Carbohidratos**

El carbohidrato más utilizado es la sacarosa, siendo la fuente más usada en el cultivo in vitro, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructuosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida con azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados. Las concentraciones óptimas son de 2 a 3 %, sin embargo, en ciertas especies se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12 % (AGUIRRE, 2010).

## **2.10 REGULADORES DE CRECIMIENTO**

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas. Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta y aquellas de origen sintético. Las que se encuentran de forma natural en las plantas se denominan fitohormonas u hormonas vegetales (CANNA, 2018).

### **2.10.1 Auxinas**

Se añaden frecuentemente a los medios de cultivo en concentración de 0,01-10 mg/l, las auxinas generalmente promueven el crecimiento vegetal por alargamiento celular.

Induciendo a la formación del callo y estimula la iniciación radicular y el crecimiento de las raíces.

El AIA es la auxina natural más difundida en las plantas, es ampliamente utilizada en los medios de cultivo, pero es sensible a la degradación enzimática (AIA- oxidasa) y a la fotooxidación a veces en asociación con el AIB.

El 2,4-D es una auxina muy fuerte, toxicas a concentraciones elevadas, que es un fuerte activador de la actividad meristemática; su empleo es amplio, muchas veces ligado a citoquininas, en trabajos de cultivos celulares, cultivos de tejidos, embriogénesis somática (CANNA, 2018).

### **Efectos**

- **Crecimiento:** estimula la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del xilema y el floema.
- **Dominancia apical:** la yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- **Abscisión de órganos (hojas, flores y frutos):** posee un control genético y las auxinas retrasan la caída, aunque el etileno lo induce.
- **Rizo génesis:** estimulan la formación de raíces laterales o adventicias, inhiben la elongación de la raíz principal. Señala que las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0,1 a 10 mg/l.

### **2.10.2 Citoquininas**

Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función citoquinecis. En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

**Naturales:**

La zeatina N<sup>6</sup> 8N<sup>6</sup>-4 hidroxil, 3 metil, 2 butiril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales.

Sintéticas:

La quinetina (KIN), N<sup>6</sup> bencilaminopurina (BAB), N<sup>6</sup> benciladenina (BA) N<sup>6</sup> dimetil alil aminopurina (2ip). (Mejia, 1994).

Efectos:

Crecimiento. En conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben. (George. 1993).

Dominancia lateral: estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio).

Diferenciación y morfogénesis: provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento, junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos (CANNA, 2018).

**2.10.3 Giberelinas**

Son hormonas que proceden de unas estructuras químicas, no de una función concreta. Su estructura química deriva del ent-giberelano. Es un grupo de hormonas muy heterogéneo que son de muchas formas, aunque pocas con función.

**Efectos:**

Estimulan el crecimiento de tallos (elongación) e hipocótilos. Tienen un papel mayor que las auxinas en plantas con crecimiento de entrenudos. En la reproducción

estimulan la floración por factores ambientales o floración del día largo como las coníferas. Producen partenocarpia & reproducción sin fecundación donde el fruto se genera sin semillas. Tienden a producir platas masculinas en especies dioicas.

La germinación es su principal efecto. Casi todas las semillas germinan inducidas por GA. Posibilitan la movilización de reserva en la semilla, sustituyen requisitos ambientales. (Roca, 1997), menciona que el uso de AG3 ha demostrado ser bastante activo, en concentraciones óptimas de 0,01 a 1 mg/1, debido a que niveles superiores a 1 mg/1 son tóxicos para el desarrollo del explante (CANNA, 2018).

## **2.11 MATERIAL DE SOPORTE**

### **2.11.1 Medios solidos**

Los medios solidos son los medios de cultivo que llevarán distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en superficie. La selección de un agente gelificante para las plantas específicas es generalmente empírica y por razones desconocidas. Los tejidos de algunas especies crecen mejor en algunos gelificantes que en otros.

El agar es el material de soporte más utilizado en el cultivo de tejidos por proveer al medio de un excelente gel húmedo; sin embargo no es inerte.

Mencionan que el agente gelificante más conocido hasta ahora probado en laboratorios locales es la carragenina, el mismo se obtiene de algas rojas como principal fuente (HURTADO, 2010).

### **2.11.2 Medios líquidos**

Los medios líquidos son una alternativa interesante para cultivar in vitro con la ayuda de un agitador, el medio de cultivo está constantemente homogeneizado y, lo que es más importante oxigenado. Estas condiciones pueden superar algunas limitantes del medio sólido; sin embargo, puede a su vez suceder una mayor susceptibilidad de los explantes a vitrificarse.

Al momento de utilizar de medios sólidos colocar el explante sobre un puente de papel filtro que permanece en contacto directo con el medio líquido, generalmente este tipo de medios es utilizado con especies de problema de oxidación (DURAN V. 2013).

## **2.12 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA DE CULTIVO IN VITRO**

### **2.12.1 Ventajas**

- Es uno de los métodos conocidos más utilizados actualmente para erradicar patógenos.
- Propagación clonal masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo.
- Reduce los costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en campo.
- Los materiales pueden ser propagados en cualquier época del año.
- Facilita el intercambio de material genético.
- Reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material por cruzamiento (RODRÍGUEZ, 2015).



### 2.12.2 Desventajas

- Requiere de personal especializado.
- Requiere de infraestructura y equipamiento.
- Los productos químicos son de elevado costo.
- Fases del proceso de micropropagación de cultivo *in vitro*.
- La micropropagación consiste en la propagación de un gen (RODRÍGUEZ, 2015).
- 

### 2.13 MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es una de las aplicaciones del cultivo *in vitro*. Se trata de una técnica de multiplicación clonar rápida que comienza con una cuidadosa selección de la planta a multiplicar (la planta madre), basándose en sus características genéticas y fitosanitarias. A continuación, se selecciona una porción de la planta madre (el explante) para comenzar con la propagación, es decir, la obtención de un gran número de individuos (clones) con idénticas características genéticas.

Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

Se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por la Ingeniería Genética, Mutagénesis o mejoramiento genético. Se utiliza también la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente (Segretín, 2015).

### **2.13.1 Etapas de la micropropagación**

La regeneración de plantas *in vitro* presenta cuatro etapas principales:

- Establecimiento del cultivo.
- Desarrollo y multiplicación de vastagos.
- Enraizamiento
- Aclimatación de las plántulas.

Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0), que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (TecnoAgro, 2018).

#### **2.13.1.1 Etapa 0**

Preparación del material Fisiología vegetal, es el empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos, la cual, puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. La planta donante debe elegirse sobre la base de una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explanto a establecer en condiciones *in vitro*.

A fin de lograr explantes de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantes mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento. Para especies ornamentales tropicales y subtropicales se recomienda mantener las plantas donantes en condiciones de alta temperatura (25°C) y baja humedad relativa (75%), a fin de reducir la proliferación de patógenos (TecnoAgro, 2018).

### **2.13.1.2 Etapa 1**

El establecimiento del cultivo es fundamental. El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explanto. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes.

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de novo) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación, basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos.

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril (TecnoAgro, 2018).

### **2.13.1.3 Etapa 2**

La Multiplicación tiene como objetivo de mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que, en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es

conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo.

La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vastago, esto último, generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

La embriogénesis somática es una vía más conveniente porque permite saltar las etapas de formación de yemas y enraizamiento regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente, disminuyendo además el riesgo de variación somaclonal.

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica, mayormente, el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente de auxinas más que citocininas) para favorecer la dediferenciación (Agropecuarios, 2012).

#### **2.13.1.4 Etapa 3 y 4.**

Las últimas dos etapas importantes son el enraizamiento y la aclimatación, debido a esto en esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las especies leñosas es complicado

por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis (Agropecuarios, 2012).

#### **2.14 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE LA MANDARINA CLEOPATRA.**

La regeneración de plantas *in vitro* vía embriogénesis somática es un prerequisite indispensable, para la aplicación de algunas herramientas de la biotecnología en la mejora genética de las plantas y más aún en el caso de los cítricos. Para aumentar la cantidad de estos cultivos en las plantaciones, se pueden usar técnicas de propagación *in vitro*, como la embriogénesis somática, que requieren de medios de cultivo artificiales y fitohormonas (Hernández M., 2007).

#### **2.15 SEGMENTOS NODALES.**

Los segmentos nodales casi siempre se hacen de las proporciones vegetativas de la planta, como los tallos modificados (rizomas tubérculos cormos y bulbos).

En la propagación *in vitro* por segmentos nodales, una parte del tallo, de la raíz o de la hoja se separa de la planta madre, se coloca bajo condiciones ambientales favorables y se les induce a formar raíces y tallos, produciendo así una nueva planta independiente que es idéntica a la planta de donde procede.

El objetivo fundamental de esta propagación se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de las hojas los cuales son divididos o subcultivados (EcuRed, 2018).

## 2.16 EMBRIONÍA NUCELAR

Se refiere a la existencia de embriones extra en una semilla, originados a partir de su tejido nuclear. Para que estos embriones puedan desarrollarse, es necesario que ocurra la fertilización y las plantas originadas a partir de las semillas son denominadas nucelares.

Estas plantas cito genéticamente iguales a la madre se caracterizan por su vigor, rápido crecimiento, presencia de numerosas espinas de gran tamaño, lentitud para iniciar la producción (variable según la especie), etc. Todas estas características se atribuyen a la juvenilidad o periodo durante el cual la planta es capaz de incrementos exponenciales en tamaño, manifiesta con gran intensidad en las plantas nucelares, como la floración no puede ser fácilmente inducida, la planta desarrolla características morfológicas típicas (hojas grandes, espinas, etc.). Plantas de cítricos propagadas vegetativamente a través de muchos años por medio de yemas sufren de paulatina declinación debido a enfermedades virosis, cuando las plantas se propagan por semilla los virus no llegan al embrión, salvo en casos excepcionales de forma que sus descendientes presentan las características cuando fueron originadas. Esta explicación, aunque no concluyentemente demostrada parece ser la más lógica. Tras sucesivas propagaciones por medio de injerto tomando yemas de las ramas más altas de las plantas donde las espinas son escasas y pequeñas, se puede ir atenuando en forma progresiva la transmisión de características poco deseables de las plantas nucelares (PAÍS, 2003).

La existencia de embrionía nucelar en muchas especies y variedades hortícolas del género Citrus y generosa afines como el pomelo y fontunella, es de importancia considerable para los científicos que trabajan con estas plantas y tiene gran significado económico para el agricultor dedicado a los cítricos.

Existen todos los grados de embrionía nucelar, algunas variedades no producen embriones nucleares y son llamados monoembrionicas o no-nucleares el híbrido "temple" la mandarina "clementina" y el pomelo citrus grandis son ejemplos importantes de cítricos monoembrionicos.

### **2.16.1 Usos de la embrionía nuclear**

A causa de su alto porcentaje de su embrionía nucelar, las plantas de cítricos provenientes de semillas tienden a mantener las características de la planta que le dio origen. El viverista que propaga los diferentes patrones a través de semillas puede obtener plantas bastantes uniformes y con todas las características de la variedad propagada. Para esto, es necesario que se eliminen todas aquellas plantas que tienen un tamaño inferior a la de la mayoría o aquellas que son más grandes. Estas plantas son consideradas de origen gamético ya que presentan una gran variación con respecto a lo normal.

Este comportamiento es muy importante ya que cada uno de los patrones actualmente utilizados posee valiosas características que se perderían si se emplearan plantas de origen sexual se podrían utilizar brotes enraizados pero el costo sería elevado y el método muy engorroso.

Existe un grupo de enfermedades virales, de gran importancia económica para los cítricos, que se transmiten únicamente por yemas provenientes de plantas enfermas. Es probable entonces producir patrones a partir de semillas que no están infectadas con estas virosis. Más aun, desde que la mayoría de las variedades de cítricos son altamente nucleares, es posible obtener una fuente de yemas libres de virus utilizando plantas nucleares de la variedad deseada (PAÍS, 2003).

## **2.17 PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un periodo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En este ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuado para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Mroginski, Sansberro, & Flaschland,2010).

### **2 171 Introducción del material in vitro**

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas de acuerdo al material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un periodo de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo del cultivo in vitro (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010).

#### **2.17.2 Medio de cultivo**

Es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer el medio requerirá una u otras condiciones. Son esenciales, por lo que, un control en su fabricación, preparación, conservación y uso asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010).



### **2.17.3 M&S: Murashige y Skoog.**

Es un medio de cultivo considerado rico en sales pues contiene altas concentraciones de amonio, es eficiente para la obtención y multiplicación de la mayoría de las angiospermas (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LOCALIZACIÓN**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el departamento de Tanja, Provincia Cercado, zona el Tejar, ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15" de latitud sur y los meridianos 64° 2V y 65° 05Me longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 msnm, específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo *In Vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma "Juan Misael Saracho".

El primer ensayo se realizó el día 11 de septiembre del 2017 hasta el 10 de noviembre de 2017.

El segundo ensayo se realizó el día 20 de noviembre del 2017 hasta el 20 de diciembre de 2017.

#### **3.2 MATERIALES**

Se utilizaron diferentes materiales para la elaboración de la multiplicación in vitro mediante medios de cultivo.

##### **3.2.1 Material vegetal**

Se utilizó brotes tiernos para la segmentación de nodales de las plantas madres, semillas de mandarina cleopatra como el material vegetal para extraer los embriones nucelares, el cual se utilizó para el presente trabajo de investigación donde se trabajó con la variedad de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*). La procedencia del material vegetal

La procedencia del material vegetal

- **Segmentos nodales:** obtenidas del vivero de El Carmen ubicado en la zona de San Blas de la ciudad de Tarija, provincia Cercado, departamento de Tarija.
- **Semillas:** obtenidas del vivero Z, ubicado en la comunidad de Emborozú provincia Arce, departamento de Tarija.
- 

### **3.3 MATERIAL DE LABORATORIO Equipos**

- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- PH-metro.
- Balanzas de precisión.
- Microscopio.
- Agitador.
- Horno de esterilización.
- Horno microondas.
- Refrigerador.
- Cámara de crecimiento

### **Materiales**

- Cajas Petri.
- Vasos de vidrio.
- Pipeta.
- Probeta.
- Tubos de ensayo.
- Canastillas.
- Mechero.
- Papel filtro.
- Papel de aluminio.

- Frascos de vidrio.
- Encendedor.
- Marcador.
- Bisturí

### **Productos químicos**

- Murashige & Skoog
- BAB- Bencil Amino Purina.
- Kinetina
- Agar.
- Sacarosa.
- Mió inositol.
- Vitaminas.
- Alcohol.
- Hipoclorito de sodio.
- Agua destilada

### 3.4 METODOLOGÍA

La metodología de investigación que se utilizó es la investigación experimental y descriptiva, se realizaron dos ensayos, el primero con la introducción de segmentos nodales y el segundo con embriones. Las variables que se evaluaron fueron: el porcentaje de contaminación, el porcentaje de regeneración y la longitud de los brotes.

#### 3.4.1 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en los dos ensayos fue completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones de acuerdo al siguiente orden:

##### **Tratamientos:**

T1: Bencil Amino Purina (BAB) 2mg/l.

T2: Kinetina (KIN) 2mg/l.

T3: BAB+KIN 2mg/l.

T4: Testigo.

Nº de repeticiones: 3

Unidades experimentales: 12

Cada unidad experimental está compuesta por 3 tubos de ensayo.

### 3.5 VARIABLES

#### a) Porcentaje de regeneración (15 días)

En las células meristemáticas existe la mayor concentración celular de toda planta, por lo tanto, esto dará función al nuevo brote en esa sección de la planta. La evaluación se la realizó a los 15 días de forma visual, después de haber realizado la introducción de la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) en el cultivo

in vitro, esperando un resultado del 100% de regeneración en las células meristemáticas.

#### **b) Porcentaje de contaminación**

La técnica de cultivo in vitro es muy propensa a la contaminación, por lo que se requiere un alto grado de asepsia para dicha técnica (HIPOCLORITO DE SODIO 1,5% Y ALCOHOL 70%). Es por esto que las muestras se sometían a sustancias que pueden eliminar los hongos y bacterias adheridas de forma superficial. Las muestras se evaluaron consecutivamente hasta los 60 días después de la primera evaluación de forma visual y con la ayuda del microscopio para así comprobar si se contaminaron dichas muestras.

#### **c) Longitud de los brotes**

Después de evaluar la regeneración de los cuatro tratamientos de la variedad de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*), pasamos a la medición de los brotes a los 60 días.

### **3.6 PROCEDIMIENTO.**

#### **a) Preparación de medios de cultivo**

Seguidamente se preparará el medio de cultivo para la mandarina cleopatra (*Citrus Reshni Hort. ex Tona ka*): **M&S: Murashige y Skoog.**

Medir las concentraciones de sales para el medio de cultivo Murashige y Skoog.

1. Se preparó el medio de cultivo en vasos de 500ml/L

Este medio de cultivo está conformado de la siguiente manera:

**TABLA N° 2 Medios de cultivo para el establecimiento de mandarina Cleopatra**  
*(Citrus reshni Hort. ex Tanaka)*

FASE	ESTABLECIMIENTO			
Medio de cultivo	T1	T2	T3	T4
	MS	MS	MS	MS
<b>Componentes</b>				
<b>Sales</b>				
Macronutrientes M&S	100%	100%	100%	100%
Micronutrientes M&S	100%	100%	100%	100%
Quelatos M&S	100%	100%	100%	100%
<b>Compuestos orgánicos (Vitaminas)</b>				
Vitaminas M&S	100%	100%	100%	100%
Myo-inisitol(mg/l)	100	100	100	100
<b>Sustancias de crecimiento (mg/l)</b>				
BAP (Bencil amino purina)	2.0		2	
KIN (Kinetina)		2	2	
Azúcar (g/l)	30	30	30	30
Agar agar (g/l)	6.5	6.5	6.5	6.5
Ph	5.7	5.7	5.7	5.7

- M1: macronutrientes.
  - M2: micronutrientes.
  - M3: fuentes de hierro Fe.
  - M4: vitaminas.
  - Sacarosa.
2. Se ha dividido en 4 vasos precipitados en partes iguales.
  3. Colocar la concentración de hormonas en cada vaso de precipitación.

BAP (Bencil Amino Purina).

Se trabajará con una concentración de Bencil Amino Purina 2mg/l.

KIN (Kinetina).

4. Se trabajará con una concentración de kinetina 2mg/l.
5. Medir el pH de los medios de cultivo con Murashige y Skoog en diferentes concentraciones de BAP y KIN en un valor de 5.7 para todos los tratamientos de trabajo.
6. Adicionar el agar 8.9 gr. a los cuatro tratamientos donde se encuentra el medio de cultivo en diferentes concentraciones de BAB y KIN, luego pasa al horno microondas para que el agar entre en calor y se pueda disolver en el líquido cuidando de no llegar al punto de ebullición del agua.
7. Retirar los vasos precipitados del horno microondas con mucho cuidado y precaución, mezclando con una varilla de vidrio, el agar comenzará a solidificar el medio cuando la temperatura disminuya, dejando a la preparación del medio de cultivo.
8. Colocar en los tubos de ensayo el medio de cultivo, señalando la canastilla para evitar confundirse con las concentraciones.
9. Tapar los tubos de ensayo.

#### **b) Preparación de la planta madre**

10. Se realizó la selección de la planta madre en el mes de octubre del vivero de San Blas de la ciudad de Tanja, y las semillas de la comunidad de Emborozú de la provincia Aniceto Arce del departamento de Tanja.

#### **c) Esterilización de los materiales de laboratorio**

1. Colocar los tubos de ensayo a la canasta de autoclave, junto con ellos también esterilizar los 6 frascos bien tapados, 4 frascos con agua destilada y dos vacíos



para utilizar más adelante, esta esterilización en la autoclave se la realiza durante 20 minutos mediante la aplicación de calor húmedo sobre una presión de 1.2 atmosferas y una temperatura de 121 °C.

4. Los materiales solidos que serán utilizados en la fase de introducción como ser: pinzas, mangos de bisturí, cajas Petri, tubos de ensayo y vasos precipitados, serán esterilizados en los hornos forrados previamente con papel periódico a una temperatura de 120°C por el lapso de dos horas.

#### **d) Desinfección de ex plantas**

3. Los segmentos nodales serán extraídos de la planta madre cortando las hojas desde el peciolo, luego se realiza el lavado con detergente en un vaso precipitado y el enjuagado con agua destilada.
4. Para las semillas se realiza la desinfección en un vaso precipitado con unas gotas de detergente y posteriormente el enjuagado con agua destilada.
5. Una vez estando con los materiales desinfectados y esterilizados, llevar a la habitación de siembra, limpiando antes la cámara de flujo laminar con alcohol.
6. Introducir a la cámara de flujo laminar los materiales que se va a trabajar teniendo muy en cuenta el protocolo, para así, evitar el mayor porcentaje de contaminación en nuestro trabajo de investigación.
7. Preparar el alcohol al 70% y también el hipoclorito de sodio al 1.5 % con la buretra de 100 ml para desinfectar los explantes y semillas.
8. Para desinfectar los explantes y semillas con alcohol e hipoclorito de sodio primero se deja los explantes (segmento nodal) dentro del frasco que contiene alcohol al 70% por 30 segundos, lo mismo para el segundo ensayo con las semillas (embrión nucelar).
9. Luego pasar los explantes al frasco que contiene hipoclorito de sodio durante 10 minutos.
10. Enjuagar 3 veces en los frascos con agua destilada por el lapso de 3 minutos en cada frasco.

### e) **Introducción en laboratorio in vitro**

11. Colocar los segmentos nodales en los tubos de ensayo que contiene el medio de cultivo flameando los materiales dentro de la cámara de flujo laminar. El mismo procedimiento con los embriones nucelares.
12. Sellar los tubos de ensayo con una cinta transparente para evitar que entre contaminación.
13. Señalar con el marcador los tubos, anotando los diferentes tratamientos para su posterior evaluación después de la introducción.
14. Llevar los tubos de ensayo dentro de las canastillas a la sala de crecimiento para que así puedan recibir las 16 horas de luz artificial.

## 3.7 VARIABLES

### a) **Porcentaje de regeneración (15 días)**

En las células meristemáticas existe la mayor concentración celular de toda planta, por lo tanto, esto dará función a un nuevo brote en esa sección de la planta. La evaluación se la realiza a los 15 días de forma visual después de haber realizado la introducción de la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) en el cultivo in vitro.

### b) **Porcentaje de contaminación**

La técnica de cultivo in vitro es muy propensa a la contaminación, por lo que se requiere un alto grado de asepsia para dicha técnica (HIPOCLORITO DE SODIO 1,5% Y ALCOHOL 70%), es por esto que las muestras se sometan a sustancias que pueden eliminar los hongos y bacterias adheridas de forma superficial.

Las muestras se evaluaron consecutivamente hasta los 60 días después de la primera evaluación de forma visual y con la ayuda del microscopio para así comprobar si se contaminaron dichas muestras.

**c) Longitud de los brotes**

Después de evaluar la regeneración de los cuatro tratamientos de la variedad de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*), pasamos a la medición de los brotes a los 60 días.

## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. SEGMENTOS NODALES - PRIMER ENSAYO

#### 4.1.1 EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE SEGMENTOS NODALES

**TABLA N°3 Análisis de regeneración de segmentos nodales.**

TRATAMI ENTOS	BLOQUES			E	E2	X
	I	II	II			
1	100	100	100	300	90000	100,00
2	100	100	100	300	90000	100,00
3	100	100	66,66	266,66	71107,555	88,89
4	66,66	33,33	100	199,99	39996,000	66,66
E	366,66	333,33	366,66	1066,65		
E2	134439,55	111108,88	134439,55			

Los resultados obtenidos en el porcentaje de regeneración nos muestran que el tratamiento 1 (bencil amino purina 2mg/l) y el tratamiento 2 (kinetina 2mg/l), fueron quienes mejor respondieron con un 100% en la etapa de regeneración. Seguido del tratamiento 3 (BAP y KIN), finalmente se obtiene el tratamiento 4 (testigo).

#### 4.1.2. Análisis de la varianza

**TABLA 4 Cuadro ANOVA**

	SC	GI	Cm	Fe	Ft5%	Ft1%
Repeticiones	185,15	2	92,57	0,20	5.14	10.92
Tratamiento	2222,67	3	740,89	1,...60	4.76	9.78
Error	2778,33	6	463,06			
Total	5186,15	14				

El cuadro de ANOVA nos muestra que los tratamientos no presentan diferencias significativas al 1% y al 5% en relación al F calculada, lo cual, se hace reflejar que los tratamientos son casi iguales.

#### 4.1.3 Prueba de medias

**TABLA N°5 Medias de diferencia significativa de cuadro de regeneración**

<b>MDS=42,9</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>88,88</b>
<b>88,88</b>	<b>11,12</b>	<b>11,12</b>	<b>0,00</b>
<b>100</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
<b>100</b>	<b>0,00</b>		

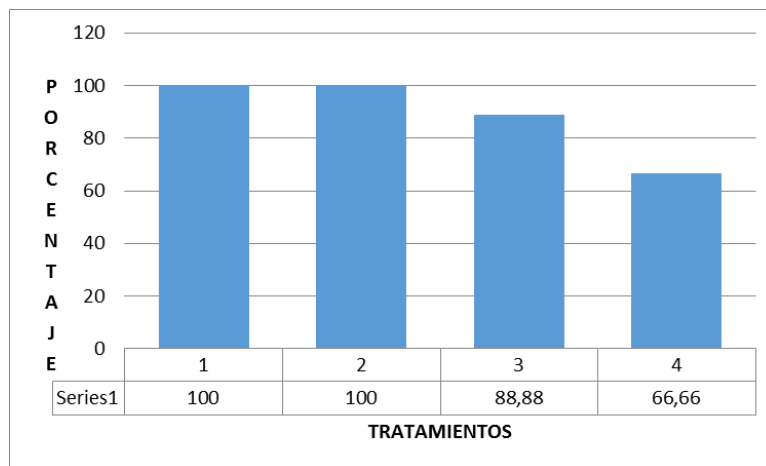
**TABLA N° 6 Diferencia de medias de tratamientos de regeneración.**

<b>N</b>	<b>Trat</b>	<b>Descripción</b>	<b>%</b>	<b>Rango</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	Bencil amino purina 2mg/l	100	A
<b>2</b>	<b>2</b>	Kinetina 2mg/l	100	A
<b>3</b>	<b>3</b>	BAB + KIN 2 mg/l	88.88	A
<b>4</b>	<b>4</b>	Testigo	66.66	A

El tratamiento 1 y 2 tuvieron una regeneración del 100% a diferencia del tratamiento 3 que tuvo una regeneración del 88,88% y tratamiento 4 con el porcentaje más bajo de regeneración diferentes, siendo las concentraciones de bencil amino purina 2 mg/l y kinetina 2mg/l las más efectivas para la regeneración de segmentos nodales.

#### 4.1.3.1 Análisis de regeneración de segmentos nodales

**FIGURA N°3 Porcentaje de regeneración del primer ensayo.**



Los mejores resultados en cuanto a regeneración se pueden observar que son el tratamiento 1 y 2 con un 100%. El tratamiento 3 con un porcentaje del 88.88% en comparación con el tratamiento 1 y 2 fue bajo su rendimiento. En cuanto al testigo su porcentaje de regeneración fue más lenta con el 66.66%.

## 4.2 EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE SEGMENTOS NODALES EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN.

**TABLA N° 7 Análisis de contaminación de segmentos nodales**

TRATAMIENTO	BLOQUES			E	E2	X
	I	II	III			
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>33,333</b>	<b>33,333</b>	<b>1111,0888</b>	<b>11,11</b>
<b>TESTIGO</b>	<b>33,33</b>	<b>66,66</b>	<b>0</b>	<b>99,99</b>	<b>9998,0001</b>	<b>33,33</b>
<b>E</b>	<b>33,33</b>	<b>66,66</b>	<b>33,333</b>	<b>133,323</b>		
<b>E2</b>	<b>1110,888</b>	<b>4443,555</b>	<b>1111,0888</b>			

Se obtuvo una evaluación en cuanto a la contaminación a los 15 días de forma visual, lo cual, el tratamiento 1, 2 fue de 0% y el tratamiento 4 con un 33,33% de muestras contaminadas, esto es debido al mal manejo de protocolo.

#### 4.2.3 Análisis de varianza

**TABLA N° 8 Cuadro de ANO VA**

	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>Cm</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft5%</b>	<b>Ft1%</b>
<b>Bloques</b>	185,13	2	92,57	0,20	5.14	10.92
<b>Tratamientos</b>	2221,78	3	740,59	1,60	4.76	9.78
<b>Error</b>	2777,37	6	462,90			
<b>Total</b>	5184,28	14				

Según el cuadro de ANO VA, no existen diferencias significativas, debido a que la Fc es menor a la Ft 5%.

Los resultados de la contaminación de todos los tratamientos son homogéneos, por lo cual, hace que no haya diferencia entre los tratamientos.

##### 4.2.3.1 Análisis de medias de diferencia de segmentos nodales

**TABLA N°9 Medias de diferencia significativa de cuadro de contaminación.**

<b>MDS=42,99</b>	<b>33,33</b>	<b>11,11</b>	<b>0</b>
<b>0</b>	33,33	11,11	0
<b>11,11</b>	22,22	0	
<b>33,33</b>	0		

#### 4.2.3.2 Análisis de diferencia de medias de los tratamientos de contaminación

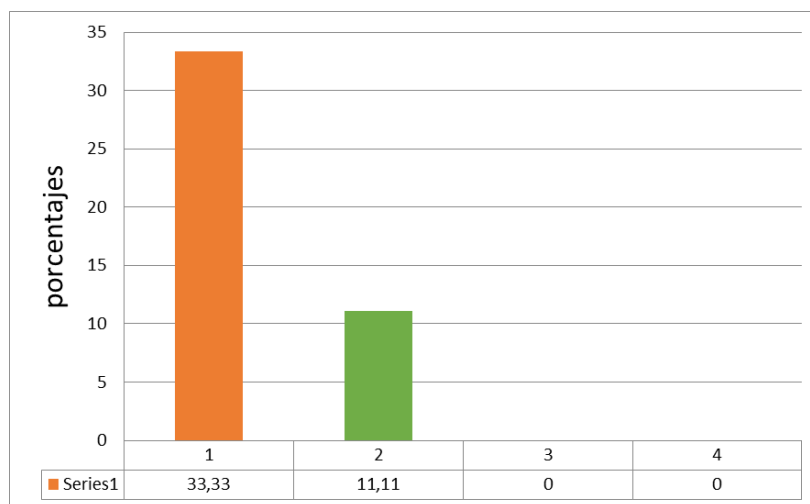
**TABLA N° 10 Diferencia de medias de tratamientos de contaminación.**

N	TRAT.	DESCRIPCIÓN	%	RANGO
1	1	Bencil amino purina 2mg/l	0	A
2	2	Kinetina 2mg/l	0	A
3	3	BAB+KIN 2 mg/l	11,11	B
4	4	Testigo	33,33	C

Las letras iguales según MDS no difieren a 5% de probabilidad

#### 4.2.3.3 Análisis de porcentaje de contaminación en segmentos nodales

**FIGURA N°4 Porcentaje de contaminación del primer**



- El porcentaje más alto de contaminación fue en el testigo, obteniendo un resultado del 33,33% de muestras contaminadas. El tratamiento 3 presentó un 11.11% de contaminación. Teniendo el tratamiento 1 y 2, 0% de muestras contaminadas.



### 4.3 EVALUACIÓN LONGITUDINAL DE BROTES EN SEGMENTOS NODALES

**TABLA N° 11 Análisis de longitud de brotes en segmentos nodales**

TRATAMIENTOS	BLOQUES			E	E2	X
	I	II	III			
<b>TI</b>	0,8	0,6	0,6	2	4	0,67
<b>T2</b>	0,4	0,3	0,1	0,8	0,64	0,27
<b>T3</b>	0,8	1,1	1	2,9	8,41	0,97
<b>T4</b>	0	0,3	0,1	0,4	0,16	0,13
<b>E</b>	2	2,3	1,8	6,1		
<b>E2</b>	4	5,29	3,24			

El tratamiento 3 fue el que mejor respondió en cuanto a crecimiento (bencil amino purina 2mg/l). seguido del tratamiento 1 (BAB 2mg/l) y finalmente 2 y 4 que su crecimiento fue bajo.

#### 4.3.3.1 Análisis de la varianza de longitud de brotes

**TABLA N° 12 CUADRO DE ANOVA**

	SC	Gl	Cm	Fc	Ft5%	Ft1%
<b>Bloques</b>	<b>0,03</b>	<b>2</b>	<b>0,02</b>	<b>0,70</b>	544	<b>10,92</b>
<b>Tratamient</b>	<b>1,30</b>	<b>3</b>	<b>0,43</b>	<b>19,30</b>	<b>4,76</b>	<b>9,78</b>
<b>Error</b>	<b>0,14</b>	<b>6</b>	0,02			
<b>Total</b>	<b>1,47</b>	<b>14</b>				

Según el cuadro de ANOVA, existen diferencias altamente significativas en tratamientos, debido a que la Fc es mayor al Ft 5% y Ft 1% que la F tabulada.

#### 4.3.3.2 Análisis de diferencia de medias tratamientos de longitud de brotes

**TABLA N°13 Análisis de diferencia de medias tratamientos de longitud de brotes.**

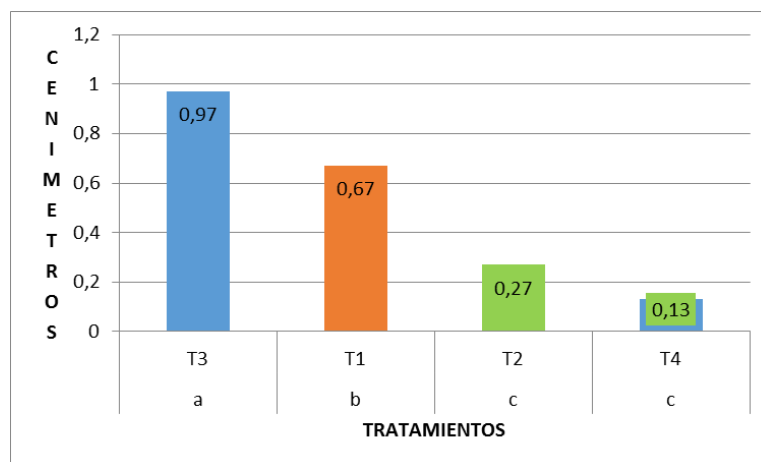
Tratamiento	MDS	0,97	0,67	0,27	0,13
T4	0,13	0,84	0,54	0,14	0
T2	0,27	0,70	0,40	0,00	
T1	0,67	0,30	0,00		
T3	0,97	0,00			

**TABLA N°14 Análisis de medias de diferencia significativas en longitud de Brotes**

N	TRAT,	DESCRIPCIÓN	CM	RANGO
1	3	BAB+KIN 2mg/l	0,97	A
2	1	Bencil amino purina 2mg/l	0,67	B
3	2	Kinetina 2mg/l	0,27	C
4	4	Testigo	0,13	C

Las letras iguales según MDS no difieren al 5% de probabilidad

**FIGURA N°5 Crecimiento longitudinal de brotes de los segmentos nodales**



Como muestra la figura 7, en la prueba de diferencias de medias, el mejor resultado fue el tratamiento 3 (BAB+KIN 2mg/l), presentado mejor respuesta de longitud de brotes, siendo estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos. El segundo resultado fue el tratamiento 1 (bencil amino purina al 2mg/l), siendo estadísticamente diferente al tratamiento 2 y tratamiento 4. Los tratamientos 2 y 4 no difieren estadísticamente.

#### 4.4 EMBRIONES NUCELARES - SEGUNDO ENSAYO

##### 4.4.1. EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE EMBRIONES NUCELARES.

**TABLA N°15 Análisis de la germinación in vitro de embriones nucleares**

TRATAMIENTOS	BLOQUES			E	E2	X
	I	II	III			
T1	66,66	66,66	66,66	199,98	39992,0004	66,66
T2	66,66	66,66	66,66	199,98	39992,0004	66,66
T3	66,66	100	33,33	199,99	39996,0001	66,66
T4	66,66	66,66	33,33	166,65	27772,2225	55,55
E	266,64	299,98	199,98	766,6		
E2	71096,889	89988,000	39992,000			

El tratamiento 1(BAB), 2(KIN) y 3(BAB+KIN) presentaron una media de 66,66% en cuanto a germinación de embriones nucleares, lo cual, fueron iguales. El tratamiento 4(testigo) con un 55,55%.

#### 4.4.2 Análisis de varianza

**TABLA N°16 CUADRO DE ANOVA**

	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>Cm</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft5%</b>	<b>Ft1%</b>
<b>Bloques</b>	1296,26	2	648,13	2,33	5,14	10,92
<b>Tratamiento</b>	277,78	3	92,59	0,33	4,76	9,78
<b>Error</b>	1666,78	6	277,80			
<b>Total</b>	3240,81	14				

El cuadro de ANOVA nos muestra que los tratamientos no presentan diferencias significativas al 1% y al 5% en relación al F calculada, por lo cual, nos refleja que los tratamientos son casi iguales.

#### 4.4.3 Prueba de medias de diferencia significativa de embriones nucleares

**TABLA N°17 Medias de diferencia significativa de cuadro de regeneración**

<b>MDS=33,3</b>	<b>66,66</b>	<b>66,66</b>	<b>55,55</b>
<b>55,55</b>	11,11	11,11	0,00
<b>66,66</b>	0,00	0,00	
<b>66,66</b>	0,00		

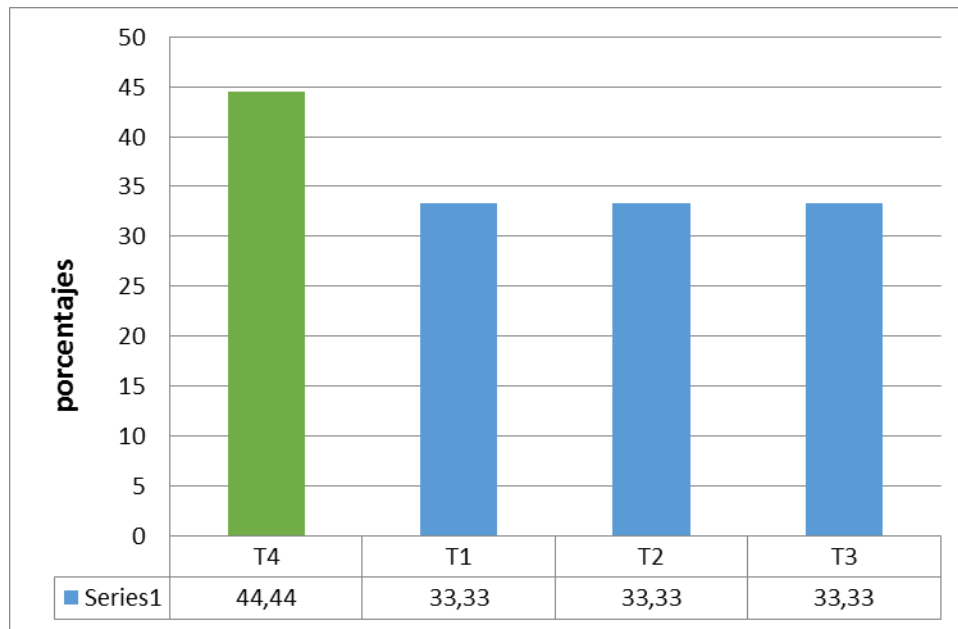
**TABLA N°18 Diferencia de medias tratamientos en regeneración**

<b>N</b>	<b>TRAT.</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>%</b>	<b>RANGO</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	Bencil amino purina 2mg/l	66,66	A
<b>2</b>	<b>2</b>	Kinetina 2mg/l	66,66	A
<b>3</b>	<b>3</b>	BAB+KIN 2mg/l	66,66	A
<b>4</b>	<b>4</b>	Testigo	55,55	A

De acuerdo a la prueba de diferencias de medias, los tratamientos en la variable longitud de brotes no presentan diferencias estadísticas.

#### 4.4.3.1 Evaluación de contaminación en embriones nucleares.

**FIGURA N °6 Porcentaje de contaminación de los embriones nucleares.**



De acuerdo a la figura 6, el tratamiento con mayor porcentaje de muestras contaminadas fue el testigo con 44,44%, seguido de los demás tratamientos 1, 2 y 3, que obtuvieron los mismos resultados con un 33,33% de contaminación.

**TABLA N°19 Resultados de contaminación en embriones nucleares.**

TRATA MIENTOS	BLOQUES			E	E2	X
	I	II	III			
<b>TI</b>	33,33	33,33	33,33	99,99	9998,0001	33,33
<b>T2</b>	33,33	33,33	33,33	99,99	9998,0001	33,33
<b>T3</b>	33,33	0	66,66	99,99	9998,0001	33,33
<b>T4</b>	33,33	33,33	66,66	133,32	17774,222	44,44
<b>E</b>	133,32	99,99	199,98	433,29		
<b>E2</b>	17774,222	9998,000	39992,000			

En este cuadro de contaminación se puede observar que la contaminación fue de un 33,33% en el tratamiento 1, 2 y 3. Por otro lado, el tratamiento 4 tuvo un 44,44% de muestras contaminadas (testigo).

#### 4.4.3.2 Análisis de varianza

**TABLA N°20 CUADRO DE ANOVA**

	SC	Gl	Cm	Fc	Ft5%	Ft1%
<b>Bloques</b>	1296,04	2	648,02	2,33	5,14	10,92
<b>Tratamientos</b>	277,72	3	92,57	0,33	4,76	9,78
<b>Error</b>	1666,33	6	277,72			
<b>Total</b>	3240,09	14				

Según el cuadro de varianza, no existen diferencias significativas debido a que la Fc es menor a la Ft 5%.

#### 4.4.3.3 Análisis de medias de diferencias significativas

**TABLA N°21 Media de diferencia significativa en contaminación**

<b>MDS=33,3</b>	<b>44,44</b>	<b>33,33</b>	<b>33,33</b>
<b>33,33</b>	<b>11,11</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>33,33</b>	<b>11,11</b>	<b>0,00</b>	
<b>44,44</b>	<b>0,00</b>		

**TABLA N° 22 Análisis de medias de diferencia de medias de tratamientos de contaminación.**

N	TRAT.	DESCRIPCIÓN	CM	RANGO
<b>1</b>	<b>1</b>	Bencil amino purina 2mg/l	33,33	A
<b>2</b>	<b>2</b>	Kinetina 2mg/l	33,33	A
<b>3</b>	<b>3</b>	BAB+KIN 2mg/l	33,33	A
<b>4</b>	<b>4</b>	Testigo	44,44	A

Según MDS, no difieren al 5% de probabilidad

En los tres tratamientos la contaminación fue igual ya que ambos presentaron un 33,33% de muestras contaminadas. El tratamiento con mayor contaminación fue el testigo con un 44,44%, los tratamientos en esta variable no son estadísticamente diferentes.

#### 4.5. Evaluación longitudinal de embriones nucleares

**TABLA N°23 Análisis de longitud de plántulas**

TRATAMIENTO S	BLOQUES			E	E2	X
	I	II	III			
<b>TI</b>	4,1	4,2	4,3	12,6	158,76	4,20
<b>T2</b>	4,35	4	3,75	12,1	146,41	4,03
<b>T3</b>	6,4	6,2	5,7	18,3	334,89	6,10
<b>T4</b>	3,25	3,05	3,9	10,2	104,04	3,40
<b>E</b>	18,1	17,45	17,65	53,2		
<b>E2</b>	327,61	304,5025	311,5225			

Como se observa en la tabla 23, la longitud del epicotilo en el tratamiento 3 (bencil amino purina 2mg/l+ kinetina 2mgr/l) obtuvo una mejor respuesta con 6,10cm. El tratamiento 1 y 2 fueron parecidos con un 4,20cm y 4,03 en cuanto a longitud de las plántulas y con un bajo crecimiento fue el tratamiento 4 (testigo).

La importancia de analizar la longitud del embrión nucelar es para saber en cuanto tiempo se obtiene una planta verdadera, además de las yemas para la multiplicación.

#### 4.5.1. Análisis de varianza

**TABLA N° 24 CUADRO DE ANOVA**

	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>Cm</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft5%</b>	<b>Ft%</b>
<b>Bloques</b>	0,06	2	0,03	0,21	5,14	10,92
<b>Tratamiento</b>	12,18	3	4,06	30,40	4,76	9,78
<b>Error</b>	0,80	6	0,13			
<b>Total</b>	13,04	14				

El cuadro de ANOVA, no presenta diferencias significativas al 1 %, ya que Fc es menor a Ft 5%.

#### 4.5.1.1. Análisis de diferencias significativas en longitud de brotes

**TABLA N° 25 Prueba de diferencias significativas**

<b>MDS=0,73</b>	<b>6,1</b>	<b>4,2</b>	<b>4,03</b>
<b>3,04</b>	<b>3,06</b>	<b>1,16</b>	<b>0,99</b>
<b>4,03</b>	2,07	<b>0,17</b>	0,00
<b>4,2</b>	<b>1,90</b>	0,00	
<b>6,1</b>	0,00		

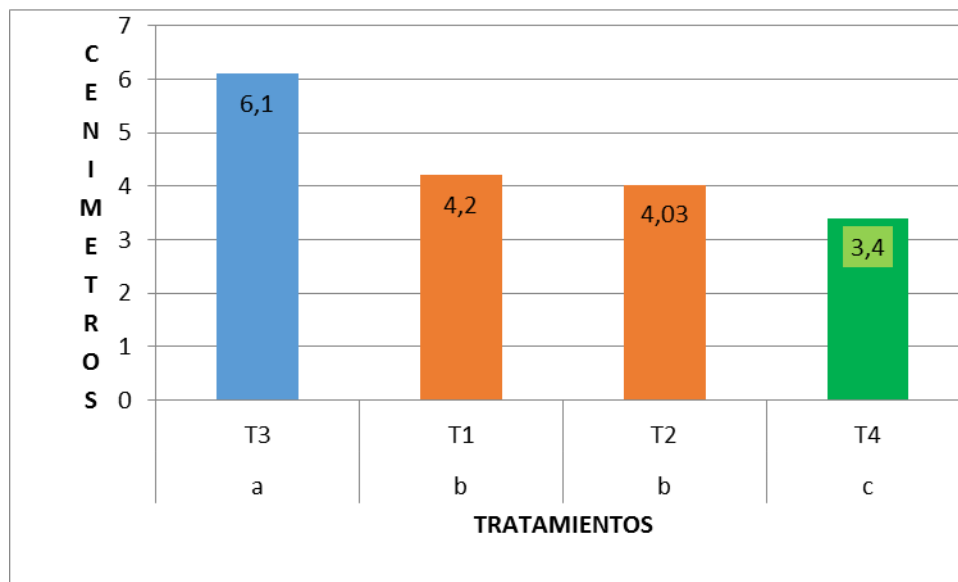
**TABLA N° 26 Análisis de diferencia de medias de tratamientos de longitud**

<b>N</b>	<b>TRAT.</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>CM</b>	<b>RANGO</b>
<b>1</b>	<b>3</b>	BAB+KIN 2mg/l	6,1	A
<b>2</b>	<b>2</b>	Kinetina 2mg/l	4,03	B
<b>3</b>	<b>1</b>	Bencil amino purina 2mg/l	4,2	B
<b>4</b>	<b>4</b>	Testigo	3,4	C



- El mejor resultado en longitud de plántulas fue el tratamiento 3 (bencil amino purina) con 6,1 cm.
- El tratamiento 1 y 2 no presentaron buenos resultados de longitud en comparación al tratamiento 3.

• **FIGURA N°7 Análisis de diferencia de medias de tratamientos de longitud de plántulas**



Según la figura N°7 el tratamiento 3(BAB+KIN 2mg/l) presenta diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos, El tratamiento 1 y 2 no son diferentes estadísticamente, pero son diferentes con el tratamiento 4.

#### 4.6. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se realizó dos ensayos, uno con segmentos nodales y el otro con embriones nucelares de la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*). Los ensayos constaban de tres tratamientos con diferentes concentraciones de fitohormonas y un testigo sin fitohormonas con el medio de cultivo Murashige Skoog en un ambiente controlado.

En el primer ensayo en los segmentos nodales se presentó una contaminación del 11.11 % y en el segundo ensayo los embriones nucelares presentaron una contaminación del 33,33 %, por lo que, se tiene que tener más cuidado en la desinfección y protocolos en cultivo in vitro con los embriones, ya que presentaron una contaminación mayor que los segmentos nodales.

El crecimiento longitudinal de los segmentos nodales fue de 0.97cm, la media en comparación de 6,1 cm de crecimiento embrionario. Se presentó mayor crecimiento longitudinal en los embriones, donde el tratamiento 3 fue el más destacado en ambos ensayos con las concentraciones de fitohormonas (BAB+KIN 2mg/l), el cual obtuvo un resultado de 6.1 cm de crecimiento longitudinal de los embriones nucelares. En cuanto a la regeneración de los segmentos nodales tenemos un 100% de regeneración con el tratamiento 1 y 2 como los más destacados y en comparación de 66.66 % de regeneración embrionaria con los tratamientos 1, 2 y 3 los más sobresalientes. Lo que podemos decir que para obtener una óptima respuesta en regeneración se debe utilizar el medio de cultivo Murashige Skoog con bencil amino purina 2mg/l o kinetina 2 mg/l , la concentración de BAB y KIN en el tratamiento 1 y 2 presentaron un regeneración a los 15 días , el tratamiento tres demoró 20 días pero tuvo mayor crecimiento longitudinal en ambos ensayos, por lo cual, se recomienda el uso de las dos fitohormonas como ser bencil amino purina 2mg / 1 y kinetina 2 mg /1.

El testigo que constaba del medio del cultivo Murashige Skoog fue el que presentó menor porcentaje de crecimiento longitudinal y regeneración en las dos pruebas segmentos nodales y embriones nucelares, en comparación del tratamiento 3 con un medio de cultivo Murashige Skoog y la concentración de las fitohormonas de bencil amino purina 2mg/l y kinetina 2 mg/l que presentaron el mayor porcentaje de regeneración y de crecimiento longitudinal.

En cuanto a la contaminación, se utilizó alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1,5% en las dos pruebas con segmentos nodales y embriones nucelares; no hubo un alto índice de contaminación.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES.

La menor contaminación en los segmentos nodales se presentó en los tratamientos 1 (bencil amino purina 2mg/l) y el tratamiento 2 (kinetina 2mg/l), con un 0%. El tratamiento que presentó mayor contaminación fue el tratamiento 4 (testigo sin fitohormonas) con un 33,3%.

Los tratamientos en la regeneración de los segmentos nodales no presentan diferencias estadísticas, el tratamiento 1 (bencil amino purina 2mg/l) presenta un 100% de regeneración; el tratamiento 2 (kinetina 2mg/l) tiene un 100% de regeneración; el tratamiento 3, (BAB+KIN 2mg/l) tiene un 88,88% y el tratamiento 4 (testigo) un 66,66%.

La mayor longitud de los brotes de segmentos nodales a los 60 días se presenta en el tratamiento 3 (BAB+KIN 2mg/l) con 0,97 cm de longitud; el tratamiento 4 sin adición de fitohormonas presenta una menor longitud de 0.13 cm.

La menor contaminación en los embriones nucelares se presentó en los tratamientos 1 (bencil amino purina 2mg/l); el tratamiento 2 (kinetina 2mg/l) y el tratamiento 3 (BAB+KIN 2mg/l), con un 33.3%. El tratamiento que presentó mayor contaminación fue el tratamiento 4 (testigo sin fitohormonas) con un 44.4%.

Los tratamientos en la germinación de embriones nucelares a los 15 días, no presentan diferencias estadísticas; el tratamiento 1 (bencil amino purina 2mg/l) presenta un 66,6%; el tratamiento 2 (kinetina 2mg/l) tiene un 66,6%; el tratamiento 3, (BAB+KIN 2mg/l) tiene un 66,6% y el tratamiento 4 (testigo) un 55,5%.

La mayor longitud de las plántulas obtenidas de los embriones nucelares a los 60 días, se las obtuvo con el tratamiento 3 (BAB+KIN 2mg/l) con 6,10 cm de longitud, el tratamiento 4 si adición de hormonas presenta una menor longitud de 3,14 cm.

## 5.2. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda para la introducción in vitro de la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tanaka*) tanto en segmentos nodales y embriones nucelares, utilizar las fitohormonas como ser BAP (Bencil Amino Purína), (Kinetina) KIN y ambas (BAB+KIN) con una concentración de 2mg/l.
- Se debe seguir un riguroso protocolo de cultivo in vitro en laboratorio para la investigación y así garantizar mejores resultados.
- Fomentar el estudio de las técnicas no convencionales para la obtención de plantas o platines en la Universidad, ya que la producción sin tierra es una tendencia futurista, debido a los cambios climáticos que ocasionan pérdidas en el agro.