

MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR



UNIVERSIDAD DE GRANMA



Facultad de Ciencias Agrícolas
Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

Unidad Académica de Ciencias Agrícolas Ambientales y
Veterinarias

Carrera de: Ingeniería Agronómica
Sede La Maná

TRABAJO DE DIPLOMA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: ingeniero agrónomo

TÍTULO: Propagación in vitro del limón criollo (*Citrus limon*) con el empleo de dos reguladores de crecimiento.

AUTORES: JOSÉ FRANCISCO CHAVEZ JÁCOME.
MARLON LENIN ARBOLEDA FABARA.

TUTOR: MSC.LILLIEN FAJARDO ROSABAL.
ING.YANET HERNANDEZ JEREZ.

“Año 53 de la Revolución”

CURSO ACADEMICO 2010 – 2011

POR LA VINCULACION DEL PUEBLO Y CON EL PUEBLO

CURSO ACADEMICO 2010 – 2011

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, Cuba, con el objetivo de lograr la formación de brotes del limón criollo (*Citrus limon*) vía organogénesis. Se evaluaron diferentes métodos de desinfección de yemas apicales de limón criollo utilizando combinaciones de hipoclorito de sodio 1,0 % (20 minutos), bicloruro de mercurio 0,1 % (10 minutos) y solución de sulfato de cobre 2,0 % (una hora) y su efecto en establecimiento *in vitro*. Se evaluó además el efecto del picloram (0,0; 0,02; 0,05 y 0,1 mg.l⁻¹) y el 2,4-D (0,0; 0,1; 0,5 y 1,0 mg.l⁻¹) en la formación de callos y órganos a partir de cotiledones. Se logró la desinfección y la mayor supervivencia de yemas apicales de limón criollo con empleo de hipoclorito de sodio 1,0 % durante 20 minutos, seguido de inmersión en bicloruro de mercurio al 0,1 % durante 10 minutos. Se obtuvo un 100% de formación de callos con la adición de picloram al medio de cultivo, independientemente de la concentración de éste. Con la aplicación de 0,1 mg.l⁻¹ de 2,4-D se obtuvo 44.4 % de brotes 33.3 % de hojas y un 55.5 % de raíces. Bajas concentraciones de 2,4-D (de 0,1 mg.l⁻¹ o menores), son suficientes para estimular una organogénesis directa a partir de cotiledones de limón criollo.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Studding Center of Plant Biotechnology of the University of Granma, Cuba, with the objective of achieving the formation of buds of the Creole lemon (*Citrus limon*) via organogenesis. Different methods of apical buds disinfection of Creole lemon were evaluated using combinations of sodium hypochlorite 1,0% (20 minutes), mercury dichloride 0,1% (10 minutes) and copper sulfate solution 2,0% (one hour) and their effect in *in vitro* establishment. It was also evaluated the effect of the picloram (0,0; 0,02; 0,05 and 0,1 mg.l-1) and the 2,4-D (0,0; 0,1; 0,5 and 1,0 mg.l-1) in formation of callus and organs starting from cotyledons. It was achieved the disinfection and the biggest survival of apical buds of Creole lemon with employment of sodium hypochlorite 1,0% 20 minutes. Followed by immersion in mercury dichloride 0,1% 10 minutes. 100% of callus formation was obtained with the picloram addition to the culture medium independently of it's concentration. With the application of 0,1 mg.l-1 of 2,4-D it was obtained 44.4% of shoots, 33.3% of leaves and 55.5% of roots. Low concentrations of 2,4-D (of 0,1 mg.l-1 or smaller), are enough to stimulate a direct organogenesis starting from cotyledons of Creole lemon.

DEDICATORIA

A mis padres: José Patricio Chávez Gómez que desde el cielo me guía por el camino correcto, Paca Anabel Jácome Amores por ser la mejor madre, por enseñarme a luchar hacia delante, por su gran corazón y capacidad de entrega, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, gracias a ustedes he llegado a esta meta.

A mis hermanos que gracias a su apoyo y excelente amistad hemos logrado superar juntos los obstáculos que nos pone la vida.

A mis abuelitos que siempre me han aconsejado para bien de mi futuro gracias por ser las personas más lindas del mundo.

A toda mi familia que siempre estamos juntos en los momentos buenos y malos.

José Francisco Chávez Jácome

DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo a dios, mis padres Javier Arboleda y Teresa Fabara a mi esposa e hija Karen Caballero y Naomi Arboleda, a Dios porque ha estado conmigo en cada paso de doy, cuidándome, dándome fortaleza y sabiduría para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento a mi esposa e hija por ser mi constante inspiración para continuar hacia el éxito, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad es por ellos que soy lo que soy ahora los amo con mi vida.

Marlon Lenín Arboleda Fabara

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por ser mi principal guía, por darme la fuerza necesaria para salir adelante y lograr alcanzar esta meta.

A mi Universidad Técnica de Cotopaxi, por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

A mis padres por su esfuerzo y perseverancia para que todos mis hermanos seamos profesionales.

A toda mi familia por darme la fuerza y empujarme hacia la superación de mi carrera.

En especial a la Ing. Yanet Hernandez y a la Msc. Lillien Fajardo por su gran apoyo y constancia en nuestro trabajo de investigación ya que sin su ayuda no se hubiese podido realizar.

José Francisco Chávez Jácome

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este proyecto están dedicados a todas aquellas personas que de alguna forma son parte de la culminación de esta investigación, mis más sincero agradecimiento hacia la Ing. Yaneth Hernández y la Msc. Lillien Fajardo, a quienes les debo gran parte de este triunfo, gracias a su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad de Granma la cual me brindo la oportunidad de realizar el trabajo investigativo además un infinito agradecimiento a la universidad Técnica de Cotopaxi por brindarme la oportunidad de capacitarme y prepararme para lograr alcanzar mi meta.

Marlon Lenín Arboleda Fabara

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. Revisión bibliográfica | 4 |
| 2.1 Generalidades del cultivo. | 4 |
| 2.1.1 Origen y Distribución: | 4 |
| 2.1.2 Descripción botánica: | 4 |
| 2.2 Taxonomía y morfología | 5 |
| 2.2.1 Variedades: | 6 |
| 2.2.2 Clima y Suelo: | 7 |
| 2.3 Propagación: | 7 |
| 2.4 Cosecha: | 7 |
| 2.4.1 Almacenamiento: | 8 |
| 2.5 Plagas y Enfermedades: | 9 |
| 2.6 Usos como alimento: | 9 |
| 2.7 Micropropagación. Generalidades:..... | 11 |
| 2.7.1 Fases del proceso de micropropagación: | 11 |
| 2.7.2 Etapas de la micropropagación de plantas: | 12 |
| 2.7.3 Ventajas y desventajas de la micropropagación: | 15 |
| 2.7.4 Factores que intervienen en la micropropagación: | 16 |
| 2.8 Micropropagación de especies leñosas: | 18 |
| 2.9 Organogénesis y embriogénesis..... | 18 |
| 2.10. Empleo de reguladores del crecimiento en el cultivo in vitro | 21 |
| III. Materiales y métodos | 23 |
| 3.1. Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de yemas apicales de limón criollo | 23 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Efecto del picloram a diferentes concentraciones en formación de callos a partir de cotiledones de limón criollo..... | 25 |
| 3.3. Efecto del 2,4-D a diferentes concentraciones en formación de callos y órganos a partir cotiledones de limón criollo | 26 |
| IV. Resultados y Discusión | 28 |
| 4.1. Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de yemas apicales de limón criollo | 28 |
| 4.2. Efecto del picloram a diferentes concentraciones en formación de callos a partir de cotiledones de limón criollo..... | 30 |
| 4.3. Efecto del 2,4-D a diferentes concentraciones en formación de callos y órganos a partir cotiledones de limón criollo | 32 |
| V. Conclusiones | 36 |
| VI. Recomendaciones | 37 |
| VII Referencias Bibliográficas..... | 38 |

I. INTRODUCCIÓN

El género Citrus es cultivado en más de 100 países, siendo una de las cosechas de fruta más importantes, por su contribución al valor económico y a la nutrición humana (Baharlas y Skene, 1886).

El limón criollo, se originó en el sur de Asia y fue transportado por los árabes a través del norte de África y llevado a España y Portugal. Llegó a América con los colonizadores españoles y portugueses en la primera parte de siglo XVI. Se cultiva en las regiones tropicales, subtropicales y semitropicales del planeta. Los principales países productores son la India, México, Egipto y los países caribeños. Se ha adaptado muy bien, llegando a convertirse en silvestre en el sur de Florida (en zonas costeras, áreas boscosas y en los cayos) y en la América tropical (Phillips *et al.*, 2008).

En Cuba, la variedad de limón que más se cultiva es la Lima persa, y su producción se concentra fundamentalmente en La Empresa de Cítricos “Victoria de Girón” de Jagüey Grande, Matanzas. Empresa mayor productora de limón de Cuba con alrededor de 258 hectáreas sembradas, aunque también se cultiva en Ciego de Ávila y Santiago de Cuba. El plan de producción reportado para el año 2009 fue de 353 toneladas de frutas, pero al cierre de agosto del propio año superaban las 375 toneladas, mientras que el pronóstico de los especialistas es duplicar las 400 toneladas en el 2010.

El empleo de las técnicas biotecnológicas como la micropropagación, ya sea a través del cultivo de meristemas y de micro injertos, en combinación o no con las técnicas de termoterapia, así como la inducción del proceso de embriogénesis somática, constituyen alternativas muy prometedoras para la propagación de plantas de cítricos libres de virus (García *et al.*, 2003). La micropropagación es una fuente ideal de células y tejidos homogéneos, este sistema es empleado en la propagación de plantas obtenidos a partir de experimentos.

En los cítricos, los métodos de multiplicación aséptica presentan numerosas ventajas, con respecto a los métodos tradicionales de propagación, debido, a que permiten obtener elevadas tasas de multiplicación en corto tiempo, empleando espacios reducidos y sin las limitaciones impuestas por la época del año. Además de que posibilitan la eliminación de patógenos no obligados y promueven la liberación de patógenos sistémicos (Chagolla, 1990).

Asimismo, como indicara Mas *et al.*, (1991), mediante esta vía se facilita el transporte e introducción de material vegetativo, sin el riesgo de transmisión de enfermedades.

Los primeros trabajos de propagación *in vitro* en cítricos se realizaron en la década de los sesenta, con la inducción de embriones nucleares en tres especies monoembrionicas de cítricos (Ranganet *al.*, 1968).

En Citrus, los mejores resultados son generalmente obtenidos a partir de explantes jóvenes (Pérez-Molphe y Ochoa-Alejo, 1997). Existen pocos protocolos que emplean explantes de plantas maduras, debido fundamentalmente a los altos niveles de contaminación, reducida o ausencia de capacidad morfogenética y pobre enraizamiento de los brotes regenerados (Olalla, Pérez *et al.*, 2009).

Entre las especies de cítricos, el limón se caracteriza por un largo periodo juvenil, lo cual limita los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, a través de las técnicas de cultivo de tejido, el uso de tejidos maduros puede ser una opción para lograr variación genética mediante la transformación genética o mutagénesis (Pérez-Tornero *et al.*, 2009).

Los trabajos sobre micropropagación de explantes de limón son muy escasos en comparación con otras especies de Citrus. Los mejores resultados se han obtenido a partir de segmentos nodales de plántulas Kotsias y Roussos, 2001 y de embriones cigóticos para formar embriones somáticos Pérez-Tornero *et al.*,2009.

En Cuba actualmente esta planta es objeto de atención por parte del Ministerio de la Agricultura, debido a la disminución drástica que han experimentado las plantaciones, por lo cual se le ha incluido en los lineamientos que rigen la

Agricultura Urbana como objetivos importantes en los subprogramas de producción de semillas.

La disponibilidad de semillas de cítricos no es constante en todo el año. Lo cual reduce la oportunidad de contar con estas cuando sean requeridas. Además su viabilidad se pierde en un periodo relativamente corto de tiempo independientemente de las condiciones de almacenaje (Sagarpa 2004); lo que reduce apreciablemente las posibilidades de propagación del cultivo. Por lo que resultan de gran importancia las investigaciones dirigidas a la obtención de una metodología para su micropropagación.

Problema:

No existe una metodología de micropropagación eficiente y reproducible del limón criollo (*Citrus lemon*), para la propagación masiva de material de calidad.

Hipótesis: Con el empleo de 2,4-diclorofenoxiacético y Picloram, es posible la formación brotes del limón criollo.

Objetivo General:

Lograr la formación de brotes del limón criollo (*Citrus lemon*) vía organogénesis.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la acción del hipoclorito de sodio (1,0 %), bicloruro de mercurio (0,1%) y el sulfato de cobre (2,0 %) en la desinfección de yemas apicales de ramas jóvenes.
2. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de Picloram y 2,4D en la formación de callos e inducción de brotes en cotiledones de limón.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades del cultivo

2.1.1 Origen y Distribución:

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre (Jiménez, 2004).

El limón criollo es nativo de la región indo-malaya. Era desconocido en Europa antes de las Cruzadas y se asume que fueron llevados a África del Norte y el Cercano Oriente por los árabes y después durante las Cruzadas desde Palestina a la Europa Mediterránea. A mediados del siglo XIII, fue cultivado y bien conocido en Italia y probablemente también en Francia (CORPEI, 2005).

Es, sin duda, introducido en las islas del Caribe y México por los españoles, y existía normalmente en Haití en 1520. El limón criollo sigue siendo más o menos cultivado a escala comercial en la India, Egipto, México, las Antillas, América tropical, y en todo el trópico del Viejo Mundo (Phillips *et al.*, 2008).

2.1.2 Descripción botánica:

El árbol del limón criollo es muy vigoroso; puede ser un arbusto y puede alcanzar de 2-4 metros de altura, con muchas ramas delgadas, y por lo general cuenta con numerosas y muy afiladas espinas axilares de 1 cm de largo.

Las hojas son perennes, alternas, agradablemente aromáticas, y formando un follaje denso; elípticas o ovoides-oblongas, redondeadas en la base, de 5-7.5 cm) de largo, coriáceas, ligeramente púrpuras cuando son jóvenes, sin brillo, verde oscuro por encima, más pálido abajo cuando maduran; con diminutos dientes, y peciolo con alas estrechas (Sagarpa, 2004).

Las flores nacen en las axilas de las hojas, son ligeramente fragantes o inodoras, de 5 cm de ancho, solitarias o de 2 a 7 en un racimo, y tienen de 4 a 6 pétalos oblongos y amplios, de color blanco, pero con un ligero tinte púrpura al principio, y un paquete de 20-25 estambres blancos con anteras amarillas.

El fruto, nace simple o en grupos de 2 o 3 (en ocasiones grandes racimos), en las puntas de las ramas, es redondo, obovado, o ligeramente elíptico, a veces con un ligero pezón en el ápice, la base redondeada o con un cuello ligero, de 2.5-5 cm de diámetro; cáscara verde y brillante cuando inmaduro, de color amarillo pálido cuando maduran; la piel desde algo rugosa a lisa, de 1.5-3 mm de espesor, la pulpa es verde-amarillenta y dividida en 6 a 15 segmentos que no se separan fácilmente; aromática, jugosa, muy ácida y sabrosa, con pocas o muchas semillas pequeñas, verdes por dentro (Phillips *et al.*, 2008).

2.2 Taxonomía y morfología

Reino: *Plantae*.

División: Magnoliophyta.

Clase: *Magnoliopsida*.

Subclase: Rosidae.

Orden: Sapindales.

Familia: Rutacea.

Género: Citrus.

Especie: *Citrus limon*

2.2.1 Variedades:

Existen pocas variedades del limón criollo, a excepción de varias selecciones sin espinas, sin embargo no hay gran variación entre los árboles silvestres y los de cultivo. 'Everglade' es una variedad obtenida de una planta de semillas de limón criollo polinizada por flores de una toronja o pomelo, pero los frutos no muestran características de toronja o pomelo (Castillo, 2004).

Son como un limón, elípticos, con el pezón bastante grande en el ápice de 4-5 cm de ancho y 4.5-5.4 cm de alto, la piel es amarillo claro cuando maduran, algo suave, grandes glándulas de aceite ligeramente hundidas; delgada, alrededor de 1,5 mm; pulpa verde claro, dividida en 8 a 10 segmentos, con paredes débiles; aromática, muy jugosa, de excelente calidad y textura; de buen sabor ácido; semillas 2 a 10, con un promedio de alrededor de 5. Los frutos nacen en grandes grupos porque todas las flores son perfectas.(Phillips *et al.*, 2008).

El árbol es muy susceptible a "withertip". "Kagzi". Es el nombre que se da al limón más cultivado en toda la India. Está representado por numerosos subtipos ligeramente diferentes en tamaño, forma y color. 'Palmetto' una selección desde semilla de un limón criollo polinizado con limón 'Sicily', descrita por primera vez por el Dr. HJ Webber en el "UnitedStatesDepartmentYearbook" en 1905; elíptico o casi redondo con un pezón pequeño en el ápice, de tamaño pequeño de 3.6-4 cm de ancho; de 3.6-4.5 cm de alto, de piel amarillo pálido cuando madura, suave, muy delgada, menos de 1,5 mm; pulpa de color amarillo verdoso pálido, de 8 a 10 segmentos; tiernos, muy jugosos, de excelente calidad, aromático, con buen sabor ácido, usualmente de 3 a 6 semillas(Phillips *et al.*, 2008).

'Yung' ('limón sin espinas') de origen desconocido, fue introducido en California desde México por George Yung alrededor de 1882. Otro tipo sin espinas fue reportado en Dominica en 1892 y, aparentemente, el mismo fue enviado al "UnitedStatesDepartment of Agriculture" desde Trinidad en 1910, y varios

árboles de limón sin espinas fueron encontrados en las plantaciones cerca de Weslaco, Texas, después de una congelación en 1925.

2.2.2 Clima y Suelo:

El limón criollo es más sensible al frío que otros limones, y sólo pueden ser cultivados en lugares protegidos en California. Prospera en un ambiente cálido y clima húmedo con precipitaciones anuales entre 203-381 mm. Sin embargo, tolera la sequía mejor que cualquier otro cítrico. Cuando hay exceso de lluvias, el árbol es susceptible a enfermedades por hongos (Abdulaziz M, 2004).

La piedra caliza de los Cayos de la Florida parece perfectamente aceptable para los limones criollos. El árbol crece bastante bien en una variedad de otros suelos. En los lugares de arena en la península de la Florida, el mejor crecimiento se logra mediante la adición periódica de cal para elevar el Ph(Phillips *et al.*, 2008).

De otro modo se obtiene una producción ligera de frutas, que serán más grandes de lo normal, con la cáscara gruesa y menos jugo. En Hawai, este limón se cultiva en arena o grava ricas y bien drenadas. Los suelos de lava porosa son aceptables si hay abundantes precipitaciones. Los suelos arcillosos y muy pesados no son adecuados (Abdulaziz M, 2004).

2.3 Propagación

El limón criollo es generalmente propagado por semilla ya que la mayoría de ellas son poliembriónicas y reproducen fielmente a los padres. En algunas áreas, los brotes de la raíz de los árboles maduros se toman y trasplantan en filas. Los brotes puede ser alentados por la excavación alrededor el árbol madre para descubrir las raíces en su totalidad o en parte (Benedito *et al.*, 2000).

Las estacas de madera madura también pueden servir para la propagación, pero no suelen desarrollar sistemas de raíces fuertes. Clones selectos se injertan en "rouge lemon" o naranja agria (Jiménez, 2004).

2.4 Cosecha

En los Cayos de la Florida, los árboles producen frutos más o menos todo el año, pero hay dos estaciones principales, mayo/junio y noviembre/diciembre. Los

frutos pueden ser recogidos cuando están aun de color algo verdes para uso doméstico o para el mercado de fruta fresca (Phillips *et al.*, 2008).

El momento ideal de cosecha es cuando ha cambiado el color de verde oscuro a claro, la superficie es lisa y la fruta se siente ligeramente blanda al tacto. Para el procesamiento, se utilizan los limones ya maduros y caídos, los que se recogen del suelo dos veces por semana.

2.4.1 Almacenamiento:

El limón criollo madura a pleno color amarillo y pierde peso rápidamente a temperatura ambiente normal en climas cálidos. En el hogar, las frutas frescas pueden conservarse de 2 a 3 semanas si se mantienen en agua en un frasco cerrado. Son propensos a lesiones por frío en refrigeración F (7° C). Una temperatura de 9° C con 85-90% de humedad relativa se recomienda para retrasar la maduración y la pérdida de humedad. Atmósferas controladas bajas en oxígeno y alto contenido de dióxido de carbono también son eficaces para prolongar la vida de almacenamiento (Kultonow, A.M, 2002).

Los experimentos en el Sudán han demostrado que los frutos embalados en bolsas de polietileno con un absorbente de etileno retrasan la maduración y la pérdida de humedad y hace posible el envío de la fruta por flete aéreo al Reino Unido. En la India, los limones recogidos verdes y recubiertos con una emulsión de cera que contenga el regulador de crecimiento, ácido indol butírico, a 2,000 ppm, pueden mantenerse a temperatura ambiente y humedad relativa de 60 a 90% por 17 días (Gitarani *et al.*, 2003).

Al final de este almacenamiento, el 75% de los frutos son vendibles, mientras que las frutas que se recubren sólo con cera son completamente invendibles. Un estudio en Trinidad demostró que el limón criollo tratado con ácido giberélico, envasado en bolsas de polietileno para retener la humedad, y almacenado a temperatura ambiente, mantienen la condición de ser comercializado por 65 días. El amarillamiento se retrasa y no hay efectos adversos en la calidad (Gitarani *et al.*, 2003).

2.5 Plagas y enfermedades

El limón criollo es atacado por algunos parásitos. El enemigo más importante es la mancha blanca, (*Unaspiscitri*), en sequías prolongadas. Las infestaciones severas causan la muerte de las ramas; los ataques ligeros inducen la división de la corteza lo cual permite la entrada de otros insectos y hongos (Phillips *et al.*, 2008).

El insecto es transportado de árbol en árbol por las hormigas. Withertip, o la antracnosis del limón, (*Gleosporiumlimeticolum*) es una grave enfermedad del limón criollo en la Florida. *Fusariumoxysporum* causa la marchitez de las plántulas en invernaderos de la Florida, induce la muerte de las ramitas en la India, y ha sido identificado en los limones injertados en la mandarina-limón Rangpur en el Brasil (Denget *al.*, 2000).

Cuando el clima es demasiado húmedo, el limón criollo es propenso al ataque de los hongos, (*Elsinoefawecetti*) causándole una costra. También está sujeto a enfermedades por algas que pueden ser graves. Los árboles son a menudo afectadas por la pudrición de cuello, provocada por *Phytophthorasp*. El hongo, *Sphaeropsistumefaciens*, causa nudos y las llamadas "escobas de brujas" que han destruido muchos árboles en Jamaica (Phillips *et al.*, 2008).

El cancro es una plaga común de los limones en la India y en 1960 el Instituto de Investigaciones Hortícolas informó que el sulfato de estreptomicina a 500 ppm redujo la incidencia en un 34%. Los frutos son afectados por organismos durante el almacenamiento, principalmente *Rhizopusnigricans* y *Penicillium spp* (Denget *al.*, 2000).

2.6 Usos como alimento

El limón criollo, a causa de su especial aroma y sabor único, es ideal para servir cortado a la mitad como decoración y como saborizador de pescados y carnes, para añadir sabor a bebidas frías, y para hacer limonada. En las Bahamas, los pescadores y otras personas que pasan días en sus veleros, siempre llevan con

ellos botellas preparadas en casa de su "old sour", jugo de limón y sal (Pelacho *et al.*; 2002).

A lo largo de Malasia, este limón se cultiva principalmente para dar sabor a las comidas y bebidas preparadas. El comercio de jugo de limón en botella es muy apreciado en todo el mundo para su uso como ingrediente en las mezclas con bebidas alcohólicas. Si el limón entero se exprime por el proceso de prensa de tornillo, el jugo debe ser tratado para eliminar algo del aceite de la cáscara (García *et al.*, 2003).

Se calcula que 2,200 libras (1 tonelada métrica) de la fruta puede producir 1,058 libras (480 kg) de jugo. El jugo del limón se convierte en sirope, salsa y pasteles similares a la tarta de limón. El "Key lime Pie" (pastel de limón de los cayos) es un plato famoso de los Cayos y el sur de la Florida, pero ahora se hace en gran parte, a partir del concentrado congelado del limón "Tahití" (Phillips *et al.*, 2008).

A menudo los limones criollos se hacen en jalea o mermelada. En Malaya, se conservan en almíbar. También se encurten en vinagre, pero primero se le hacen 4 incisiones en el ápice, y se cubren los frutos con sal, antes de conservarlos en vinagre. Antes de servir, los limones encurtidos se fríen en aceite de coco y azúcar y luego se comen como aperitivos.

El aceite derivado del limón criollo se obtiene por tres métodos diferentes en las Antillas:

1) Extracción a mano en un embudo de cobre tachonado con puntas (que se llama un écuelle), en el que se rota el limón sobre las puntas para que se rompan las glándulas de aceite de la cáscara. Este método produce el aceite de la más alta calidad pero se obtiene en cantidades limitadas. Es un importante saborizante de caramelos (Castillo, 2004).

2) Extracción del aceite por prensado en frío a máquina, las mitades de limón se prensan después de haberse sacado el jugo, o simultáneamente, pero sin contacto entre ellos.

3) Por destilación de la pasta aceitosa que flota en la parte superior de los tanques en los que los frutos que han sido lavados y triturados se dejan reposar durante 2 semanas a un mes. Este método produce el mayor porcentaje de aceite. Con los terpenos y sesquiterpenos eliminados, es ampliamente utilizado para saborizar refrescos, confitería, helados, sorbetes y otros productos alimenticios (Castillo, 2004).

2.7 Micropropagación

2.7.1. Generalidades

Es el 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, tales como aquellas creadas por 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.

La multiplicación vegetativa *in vitro* es comúnmente denominada micropropagación, abarca diferentes técnicas de multiplicación, proliferación de brotes axilares, formación de nuevas yemas axilares (organogénesis) y embriogénesis somática en la producción de plantas a partir de yemas axilares. Se ha demostrado que constituye el método más confiable de la propagación *in vitro* porque asegura la estabilidad genética. Por estas razones constituye la vía de multiplicación más utilizada (Paneque, 2006).

2.7.2 Fases del proceso de micropropagación:

Dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas.
- 2: Introducción del material seleccionado *in vitro*.
- 3: Multiplicación de brotes.

- 4: Enraizamiento.
- 5: Aclimatación.

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro* puede ser aplicada a diferentes especies vegetales. Se utiliza correctamente la propagación comercial de plantas en la cual se puede alcanzar una norma más alta de homogeneidad (Gamboa y Núñez, 2001).

En algunas especies, esta metodología ha demostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, los más importantes según, Maceo (2007).

- Incremento acelerado del número de plantas divididas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidades de propagar grandes cantidades de una especie reducida, a bajo costo y en tiempo económicamente costeable.
- Mayor control de la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente variedades de la cual existen pocos individuos.

2.7.3 Etapas de la micropropagación de plantas:

Debido a la información acumulada, la mayoría de los micropropagadores de plantas en el mundo están de acuerdo en que realmente se pueden diferenciar 5 fases críticas para lograr una exitosa multiplicación de plantas (Murashige y Skoog, 1978).

- Fase cero - 0 (Preparativa): Esta etapa inicial comprende la selección de la planta madre y la selección de una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*.

- Fase I Establecimiento o Iniciación de los cultivos: El objetivo de esta fase es establecer *in vitro* el cultivo actual o primordio con los cuales iniciar el proceso de propagación.
- Fase II Multiplicación: Se considera la etapa más importante del proceso, donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.
- Fase III Enraizamiento: Corresponde al enraizamiento o etapa de pretransplante, tiene como objetivo producir una planta autótrofa que puede sobrevivir en condiciones de transplante al suelo.
- Fase VI Aclimatización: Es la fase final del proceso por tanto su meta es lograr que la planta esté lista para su transplante definitivo a campos comerciales de producción o invernadero.

Fase O. (Preparativa).

Existe un consenso de que es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible. La misma tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Zayas, 2005).

Fase. I Establecimiento o Iniciación

El objetivo de esta etapa es lograr un cultivo axénico y viable, fisiológicamente vigoroso con el cual iniciar el proceso de multiplicación. Una vez seleccionado el explante se requiere desinfectarlo suficientemente, por la razón de que en el medio de cultivo pueden crecer bacterias y hongos que competirán ventajosamente con el explante (Pérez y Gómez, 1998).

El cultivo *in vitro* puede iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta, sin embargo, la fuente inicial del material vegetal puede ser determinante para el éxito de las plantas en el establecimiento del cultivo. Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas y aquellas partes que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas de las plantas, por lo que es

recomendable utilizar las plantas más jóvenes como fuentes de explantes (Rossel, 1990).

Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio Ca (ClO)₂, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl₂). Además se pueden añadir algunas gotas de Tween-20 (Zayas, 2005).

Fase II. Multiplicación *in vitro*

Es la fase más importante y determinante en todo el programa de propagación, *in vitro* es aquella que realiza la verdadera multiplicación con la micropropagación de una especie o variedad definiéndose el número de plantas y propágulos a obtener, sin embargo su calidad genética debe vigilarse, pues en esta fase pueden producirse variaciones somaclonales (Maceo, 2007).

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos, plantas, microtubérculos o microbulbillos a partir de explantes ya establecidos *in vitro* sin sacrificar los objetivos de la fase siguiente (Pérez y Gómez, 1998).

Fase III. Enraizamiento *in vitro*

Se caracteriza por ser la fase más voluminosa de todo el proceso. En ella cada brote o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación debe desarrollar raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transplantarse sobre un sustrato envejecido y convertirse en una planta aclimatada lista para ser llevada al campo (Orellana, 1998).

Para lograr la mayor eficiencia biológica en esta fase deben manejarse varios factores entre ellos: medios de cultivos simples y de ser posible en estado líquido, sustituir el uso de componentes del medio de cultivo con sustancias químicas de calidad técnica, luz natural como fuente de iluminación, frascos de cultivo con dimensiones adecuadas para cada especie, disminuir el riesgo de contaminación (Pérez y Gómez, 1998).

Fase IV. Aclimatización

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen en condiciones de baja intensidad luminosa, alta humedad relativa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios de cultivos ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo (Barranco, 2001).

Estos cambios provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante a condiciones ambientales, lo que hace necesario aplicar técnicas de aclimatización *in vitro* y *ex vitro* que garanticen un retorno gradual de éstas a sus características morfológicas normales (Agramonte *et al.*, 1998).

Para evitar el exceso de transpiración de las plantas hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula es necesario mantener una alta humedad relativa mediante el riego o colocando cobertores de polietileno sobre las plantas y retirándolos unos días después (Agramonte *et al.*, 1998).

2.7.4 Ventajas y desventajas de la micropropagación:

Algunos sistemas de micropropagación han demostrado ventajas con respecto a los sistemas convencionales de propagación. Entre las más importantes según (Zayas 2005) son:

- Los cultivos se llevan a cabo con piezas muy pequeñas de la planta (explantes) y en algunas especies la micropropagación ha demostrado que solo se requiere de un pequeño espacio para mantener las plantas e incrementar su número en condiciones asépticas.
- Las técnicas *in vitro* son adecuadas cuando se requiere especialmente de un alto volumen de producción que por las vías convencionales son difíciles de lograr.
- Las plantas pueden adquirir nuevas características temporales a través de la micropropagación que las hace más deseables para el agricultor que las plantas cultivadas convencionalmente.

Gamboa y Núñez (2001) plantearon que aunque puede obtenerse una gran producción existen algunas desventajas:

- Las plantas obtenidas son inicialmente pequeñas y a veces tienen características indeseables.
- Los explantes cultivados *in vitro* para sobrevivir tienen que crecer en un medio de cultivo que contenga sacarosa u otra fuente de carbono.
- Los cultivos *in vitro* inicialmente deben poseer un período de transformación antes de que sean capaces de crecer inmediatamente.
- Su cultivo en frascos de vidrio provoca una alta humedad relativa, causando que las plantas jóvenes sean más susceptibles a la pérdida de agua en ambientes externos. Por esta razón, debe incluirse una atmósfera con un lento decrecimiento de la humedad e incremento de la luz para facilitar su adaptación a las condiciones ambientales. La posibilidad de obtener plantas genéticamente aberrantes puede incrementarse.

2.7.4 Factores que intervienen en la micropropagación:

- El estado fisiológico de las plantas donadoras y la época del año son aspectos de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. La época del año es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormancia que presentan ciertos explantes (yemas) (Echenique *et al.*, 2004).
- La atmósfera gaseosa es un factor determinante en los procesos morfogénicos y está condicionada por el tipo y tamaño de los frascos seleccionados así como por el sistema de cobertura de los mismos (Radice, 2004).
- El ambiente *in vitro* se caracteriza por alta humedad relativa, temperatura constante, bajo nivel de densidad de flujo de fotones fotosintéticos,

fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar, sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, acumulación de sustancias tóxicas y ausencia de microorganismos. Esto causa bajos niveles de transpiración, absorción de nutrientes, CO₂ así como un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que resulta en un pobre crecimiento celular (Barbón, 2003).

- El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* como para la proliferación de callos o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Radice, 2004).
- La capacidad de regeneración de un explante depende en gran medida del genotipo, incluso dentro de la misma especie, lo que refleja diferencias en el poder de activación de las rutas embriogénicas (Parrot, 1993).
- Es conocido que la luz y la temperatura han sido considerados los factores físicos más importantes en la micropropagación. La luz es uno de los factores que determina el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar la luz en los cultivos *in vitro* (Pelacho *et al.*, 2002).
- El fotoperíodo puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento donde cambios en la intensidad luminosa pueden causar organogénesis y cambios morfológicos específicos debido a la longitud de onda de la iluminación (Pérez, 2006).
- Echenique *et al.*, 2004 plantean que la edad y el tamaño del explante son factores indispensables a tener en cuenta en la micropropagación y consideran que las posibilidades de que este proceso ocurra de forma exitosa se incrementan si se emplean tejidos jóvenes y explantes mayores.

2.8 Micropropagación de especies leñosas

Fortalecer las capacidades de multiplicación de especies leñosas, con la revigorización y rejuvenecimiento vegetal, es uno de los ejes centrales de la investigación que realiza el Laboratorio de Biotecnología Forestal.

El Laboratorio de Biotecnología Forestal ha investigado y probado diversas técnicas de micropropagación en árboles exóticos y nativos de interés forestal-maderero (pino radiata, eucalipto, álamo, coigüe, roble y raulí); fruto forestal (castaño, cerezo, nogal y avellano) y ecológico ambiental (avellano, pitao, keule) (Castillo, 2004).

En la mayoría se ha logrado exitosamente la propagación a partir de tejidos de origen embrionario (semillas) o por vía asexual (estacas, injertos, acodos), aportando a otro objetivo de la propuesta científica del: generar genotipos de elite.

2.9 Organogénesis y embriogénesis

La micropropagación es parte de la propagación vegetativa y permite la multiplicación de plantas a partir de pequeñas porciones de tejido vegetal. Conocida también como cultivo *in vitro*, se asocia directamente a la organogénesis y embriogénesis somática.

La primera permite formar órganos a partir de partículas de tejido o de órganos completos (hojas, tallos, yemas). La segunda apunta a la obtención, desde tejidos somáticos (no sexuales), de estructuras similares a las que origina la fecundación sexual y la posterior formación de semilla. Estas estructuras, llamadas embriones somáticos o embrioides, tienen la misma forma y funcionamiento de un eje embrionario natural de origen sexual, pero carecen de endosperma y material de reserva.

La embriogénesis somática de leñosas, ofrece más opciones de manipulación de tejidos. Ya se han establecido las metodologías de propagación somática para roble y raulí (con el que se han registrado los mayores avances), y están a punto

de hacerlo para eucalipto (glóbulos y nitens) y castaño, en los que están pendientes las fases de maduración y germinación de los embrioides producidos y su encapsulamiento para generar semillas artificiales Castillo, 2004).

En cultivo *in vitro*, por vía sexual, es importante cautelar el estado de desarrollo del tejido al momento de su colecta. Los mejores resultados se alcanzan con semillas inmaduras, que tienen la desventaja de la limitación temporal en la recolección desde los árboles madres y la manipulación del germoplasma seleccionado, si no se cuenta con el almacenaje adecuado.

Como alternativa, se ha experimentado con semillas adultas, logrando estandarizar los protocolos de multiplicación para eucalipto (glóbulos y nitens), pino radiata, araucaria, roble, raulí, coigüe, avellano, nogal, castaño, cerezo, pitao y álamo, cuyas plantas están siendo probadas en terreno.

A pesar de las ventajas de las semillas de origen sexual, el LBF ha establecido una línea de trabajo con tejido somático. En este caso, la edad de la planta madre juega un rol fundamental.

La mayor parte de las investigaciones se realizan a partir de plantas juveniles. El Laboratorio ha apostado al trabajo con tejidos colectados en plantas adultas, donde la selección de los genotipos es más sencilla porque en ellas todas sus características están a la vista.

En esta área, se han alcanzado resultados exitosos en especies fruto-forestal como castaño y nogal, y en pino radiata y eucalipto glóbulos. Estos resultados se están validando en viveros y plantaciones.

En busca de la mayor aplicabilidad de los sistemas de multiplicación de genotipos selectos, está investigando la revigorización de material adulto mediante inductores de juvenilidad. Están concluidos los estudios fisiológicos y bioquímicos sobre la relación entre tejidos adultos y juveniles y del manejo de los efectos recíprocos a nivel metabólico.

La idea es transmitir el metabolismo juvenil a los tejidos viejos para que se reproduzcan y crezcan a mayor velocidad. El proceso consiste en someter las yemas durmientes del árbol elegido a un proceso de estimulación climática (desarrollado por el Laboratorio) para luego ser enraizadas, cultivadas in vitro o destinadas a las cadenas proliferativas, que reproducen el material genético a partir de porciones de hojas, tallos o raíces. La técnica se ha aplicado en la propagación de castaño y podría extenderse a otras especies (Castillo, 2004).

La organogénesis se refiere al proceso donde las células pueden ser inducidas para formar plantas completas. Caracterizada por la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez, 1998).

Los callos son en principio un tejido no organizado y poco diferenciado, sin embargo, se pueden encontrar tejidos diferenciados en agregados grandes de tejidos callosos. Cuando se examina de forma crítica un tejido de callo, puede verse que está lejos de ser homogéneo al estar generalmente constituido por tejidos diferenciados y no diferenciados (Jiménez, 1998).

Después de conseguir la inducción, el callo se cultiva sobre un medio. El primer repicado suele llevarse a cabo sobre un medio sólido, aunque en algunos casos es posible empezar sobre un medio líquido. Las condiciones de crecimiento son semejantes a las utilizadas para la inducción; solo las concentraciones de auxinas y citoquininas son normalmente más bajas o sin la presencia de ellas. Si el crecimiento del callo se detiene después de repicado, indica que el medio no resulta adecuado. En ocasiones el crecimiento del callo no es viable sobre medios sintéticos por lo que se deben añadir sustancias como: leche de coco, hidrolizado de caseína, extracto de malta o de levadura, entre otros (Coello, 1998).

Tanto en la embriogénesis somática como en la organogénesis para formar una planta ya sea vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de

cultivo, ya que aquellos que inhiben la formación de raíces favorecen el desarrollo vegetativo y viceversa (Pérez y Gómez, 1998).

(Ziv, 1999) planteó que el proceso organogénico se inicia con cambios en una célula del callo o un conjunto de ellas y solamente un pequeño número de células del explante dan lugar a la formación de callos que luego regeneran plantas.

2.10. Empleo de reguladores del crecimiento en el cultivo in vitro

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de la planta actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Estas son sustancias endógenas insustituibles para la planta, pues en su interrelación deciden el crecimiento y las bases para su desarrollo. Se encuentran íntimamente relacionadas con las zonas de crecimiento en las plantas y son las encargadas de desencadenar todos los procesos que ocurren en los tejidos (Takahashiet *al.*, 1995).

Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo in vitro (González *et al.*, 2007).

Dentro de los reguladores del crecimiento vegetal, se encuentran un grupo de sustancias de elevada actividad biológica, que generalmente se desplazan desde su lugar de síntesis con cierta dirección y velocidad hasta el lugar de acción, causando un efecto de crecimiento específico o de diferenciación (González *et al.*, 2007), entre los que se encuentran:

Auxinas: De las auxinas naturales el AIA es el compuesto más utilizado en los medios de cultivo pero es sensible a la degradación enzimática (AIA-oxidasa) y a la fotooxidación. También se utiliza un número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se producen sintéticamente; son las llamadas “auxinas sintéticas” (2,4D, ANA y AIB) (González *et al.*, 2007). En algunas investigaciones donde se han estudiado varias auxinas se ha observado que el AIA y el ANA promueven la formación de estructuras embriogénicas, mientras que el

2,4-D estimula la formación de callos de menor tamaño, poco compactados y con menor capacidad de regeneración (Trejo *et al.*, 2002).

Citoquininas: Las citoquininas juegan un importante papel en la regulación de la división celular e intervienen como las auxinas en el control de muchos aspectos del crecimiento y del desarrollo de las plantas. La formación de raíces, parte aérea y callos en el cultivo de tejidos son reguladas por la disponibilidad e interacción de estas dos clases de reguladores del crecimiento (Frank y Schmölling, 1999).

Son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, que se han informado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos y nódulos radicales, en frutos y semillas inmaduras de maíz (zeatina) hidrolizadas de ARNt de plantas o microorganismos (González *et al.*; 2007).

El tidiazurón (TDZ) es una fenilurea con alta actividad como citoquinina y se ha utilizado para la regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* en especies recalcitrantes (Paneque, 2006).

Giberelinas: Son diterpenos (con C₂₀; C₁₉) con una estructura básica denominada esqueleto gibánico o giberelano; la giberelina más difundida es el AG₃ o ácido giberélico. Estas hormonas endógenas se emplean poco en cultivo *in vitro* ya que hay numerosas experiencias que indican un efecto inhibitorio sobre la organogénesis y, particularmente la rizogénesis (Crozier, 1981).

Ácido Abscísico y etileno: El ácido abscísico favorece la maduración de los embriones somáticos, facilita la formación de bulbos y tubérculos y promueve el desarrollo de la dormancia. El etileno es la única hormona gaseosa conocida la cual estimula la senescencia de las hojas y la maduración de los frutos (González *et al.*; 2007)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue desarrollada en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma en el período comprendido entre octubre de 2010 a Enero del 2010.

Condiciones Generales para el Trabajo en el Laboratorio

El pesaje de los componentes de los medios de cultivo se realizó en la balanza analítica modelo SARTORIUS y el pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7 antes del autoclaveado. Los medios de cultivo y el instrumental (pinzas y bisturís) fueron esterilizados en autoclave vertical a 121°C de temperatura y a 1,2 Kg. cm.⁻² de presión durante 25 minutos.

La manipulación del material vegetal se efectuó en la cabina de flujo laminar (FASTER) empleando para la desinfección etanol al 70%. El instrumental, durante el trabajo en el flujo laminar, se esterilizó en el steri a una temperatura de 250°C.

Medio de cultivo para establecimiento y condiciones de incubación

Para el experimento 3.1 se empleó un medio compuesto por: Macro DKW-A 100 ml, macro DKW – B 100 ml, micro DKW 10 ml, vitaminas DKW 1,0 ml, sacarosa 30 g.l⁻¹, BAP 2,0 mg. ml⁻¹ y agar-E 6,0 g.l⁻¹ propuesto por (Olaya *et.,al*, 2009). Las condiciones de incubación fueron en luz natural durante 4 semanas.

3.1. Desinfección y establecimiento *in vitro* de yemas apicales de limón criollo

Este experimento se realizó con el objetivo de lograr establecer yemas de limón criollo libres de contaminación microbiana. Para ello, se utilizó como material de partida yemas apicales tomados de ramas secundarias de plantas maduras de

limón criollo, ubicadas en el poblado de Monte Carlos. Barrancas. A los cuales se les realizaron diferentes métodos de desinfección.

Las yemas apicales, se lavaron durante 30 minutos en agua corriente con detergente en agitación continua (zaranda), posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se desinfectaron superficialmente según se describe a continuación.

Tratamientos

I.-Hipoclorito de sodio (NaClO^-) 1,0 % durante 20 minutos. Lavado con agua destilada estéril 4 veces. Luego inmersión en bicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,1 % durante 10 minutos, seguido de Lavado con agua destilada estéril 4 veces.

II- Hipoclorito de sodio 1,0 % durante 20 minutos. Lavado con agua destilada estéril 4 veces. Se eliminó el agua y se mantuvieron los brotes tapados en el recipiente durante 24 horas en flujo laminar. Pasado este tiempo, se sumergieron en solución de bicloruro de mercurio al 0,1 % durante 10 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada estéril 4 veces.

III.- Se siguió la misma metodología del tratamiento 2 hasta mantener los explantes tapados durante 24 horas en flujo laminar. Pero luego se sumergieron en solución de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 2,0 % durante una hora y se lavaron con agua destilada estéril 4 veces.

Posteriormente se cortaron los explantes hasta un tamaño aproximado de 1,0 cm para establecerlos a razón de uno por tubo de ensayo de 15 cm de largo y 2,0 cm de diámetro, distribuyéndose a razón de 10 ml.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 25 repeticiones, cada muestra constituyó una repetición.

Luego a los 7, 21 y 30 días después de la siembra, las variables evaluadas fueron:

- ✓ Desinfección (%).Se determinó por conteo del número de explantes contaminados.

- ✓ Inicio de la brotación de las yemas (días), como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Inicio de la brotación

- ✓ *Supervivencia*: Se determinó por conteo del número de explantes vivos.

3.2. Efecto del picloram a diferentes concentraciones en formación de callos a partir de cotiledones de limón criollo

Debido al papel estimulante que se le atribuye a las auxinas tanto en la formación de callos como en el alargamiento celular; se realiza este experimento con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de esta auxina sintética en la callogénesis. Para lo cual se tomaron como explantes cotiledones de embriones cigóticos (semillas) de limón de las mismas plantas donadoras.

Para la desinfección de las semillas, éstas se lavaron previamente en solución de detergente al 1,0 % en agitación por 30 minutos. Seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y luego inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 2,0 %, en cabina de flujo laminar, seguido de 4 enjuagues con agua destilada estéril.

Las semillas una vez desinfectadas, con ayuda del bisturí, fueron desprovistas de su cubierta. Utilizando para la siembra sólo los cotiledones desnudos, separados y colocados con la superficie abaxial en contacto con medio de cultivo para la inducción de la callogénesis.

El medio de cultivo estuvo compuesto por: Sales MS 4.32 g.l⁻¹, Vitaminas MS 10 ml, Myoinositol, 100 mg, Sacarosa 30 g y Agar 6 g.l⁻¹ propuesto por (Olaya *et.,al*, 2009). Los tratamientos empleados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Concentraciones de picloram adicionadas al medio de cultivo de formación de callos.

| Tratamiento | Picloram (mg.l⁻¹) |
|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | Control |
| 2 | 0,02 |
| 3 | 0,05 |
| 4 | 0,1 |

A los 20 y 30 días de cultivo se evaluó:

- **Formación de callos %.**
- **Longitud de raíces.**

3.3. Efecto del 2,4-D a diferentes concentraciones en formación de callos y órganos a partir cotiledones de limón criollo

Con el objetivo de comparar el efecto de otra de las auxinas sintéticas más empleadas en el cultivo *in vitro* de especies leñosas, se realiza este experimento con la aplicación de 2,4-D a diferentes concentraciones. La desinfección y el establecimiento se realizaron como se explicó en el experimento 2.

Los tratamientos empleados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Concentraciones de 2,4-D adicionadas al medio de cultivo de formación de callos.

| Tratamiento | 2,4 D (mg.l⁻¹) |
|--------------------|----------------------------------|
| 1 | Control |
| 2 | 0,1 |
| 3 | 0,5 |
| 4 | 1,0 |

A los 10, 20 y 30 días de cultivo se evaluó:

- Longitud de raíces.
- Longitud de brotes.
- Formación de callos (%).

Análisis estadístico

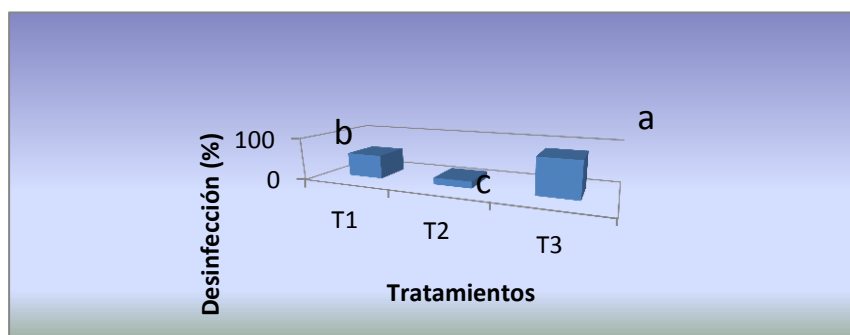
Los datos obtenidos al evaluar la desinfección, supervivencia, porcentajes de callos formados, longitud de la raíz y de los brotes fueron procesados mediante un análisis de comparación de proporciones utilizando un paquete Estadístico STATISTICA (1998) versión 6.0 sobre Windows. En todos los casos cuando existieron diferencias significativas entre las medias se utilizó la prueba de Tukey para un nivel de significación del 5.0 %.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Desinfección y establecimiento *in vitro* de yemas apicales de limón criollo

La presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, es uno de los principales problemas durante el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas leñosas, sobretodo de condición adulta y cultivadas directamente en el campo (Biasiet *al.*, 1994).

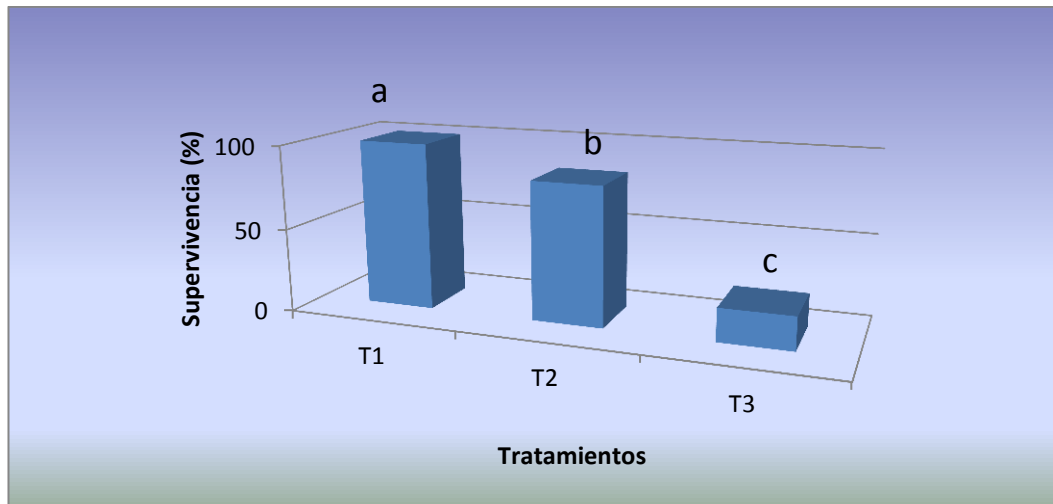
En la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos en el experimento 1 con los tres métodos de desinfección evaluados. Los mejores resultados de desinfección se obtuvieron con el empleo de la doble desinfección (con intervalo de 24 horas) con hipoclorito de sodio 1,0 % durante 20 minutos y solución de sulfato de cobre al 2,0 % (tratamiento 3), con diferencias estadísticas con los restantes tratamientos. Lo cual demuestra la eficiencia de este desinfectante en la eliminación de los contaminantes microbianos visibles para este tipo de explante en el limón. Mientras que los niveles más bajos de desinfección se mostraron cuando se realizó doble desinfección (con intervalo de 24 horas) con la combinación de hipoclorito de sodio con bicloruro de mercurio.



Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Figura 2. Porcentaje de desinfección de yemas apicales de limón criollo

Al analizar el porcentaje de supervivencia de los explantes (Figura 3) los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento 1, con la doble desinfección con hipoclorito de sodio seguido de bicloruro de mercurio. Con diferencias estadísticas con los dos restantes tratamientos. Los brotes obtenidos de los tratamientos donde se empleó bicloruro de mercurio, no se mostraron dañados en modo alguno por la desinfección inicial, como se muestra en la figura 4.



Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Figura 3. Porcentaje de supervivencia de yemas apicales de limón criollo

Estos resultados son similares a los alcanzados por Ramírez *et al.* (1999) quienes lograron la desinfección total de explantes nodales en *Psidium guajava* y *P. friedrichsthalianum*, pero utilizando nitrato de plata y bicloruro de mercurio. Similares además, a lo obtenido por Ramírez y Serrano (2004) quienes obtuvieron buenos resultados de desinfección de segmentos nodales de diferentes cítricos con hipoclorito al 2,0 % durante 15 minutos.

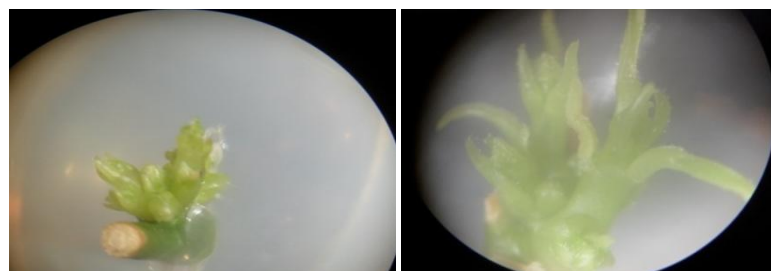


Figura 4. Brotes de yema apical a los 15 y 30 días de establecidas.

En otras leñosas como *Tectonagrandis*, Aguilar *et al.*, 2003, obtuvieron un 90 % de desinfección, al utilizar hipoclorito de sodio 2,0% durante 10 minutos.

Collado *et al.*, (2004) en la caoba(*Swieteniamacrophylla*), para el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales obtuvo los mejores resultados con la utilización de NaClO al 3.0 % durante 20 minutos.

Fajardo y Freire (2006) para la desinfección de yemas axilares de *Guadua angustifolia*, obtuvieron los mejores resultados con el empleo de hipoclorito de sodio (2.0 %) durante 20 minutos con sólo un 35.90 % de contaminación. Resultados similares obtuvo para esta misma especie, Marulanda *et al.* (2005), quien alcanzó un 74.6 % de explantes libres de contaminación microbiana al emplear bicloruro de mercurio (0.3%) durante 10 minutos.

En otras especies como *Dendrocalamusstrictus*, *DendrocalamusAsier*, *Phyllostachyseudulis*, *Dendrocalamusgiganteus* y *Bambusapolymorfa*, se emplea hipoclorito de sodio 0.1 %, durante 5 minutos, combinado con inmersión en bicloruro de mercurio (0.1%), durante cinco minutos (ICFRE, 2002).

De este experimento, se puede concluir que a pesar que los mayores niveles de desinfección se obtuvieron en el tratamiento 3; la respuesta biológica a la supervivencia, que es fundamental para el establecimiento, es la más baja. Por lo que se sugiere el empleo del tratamiento 1, para la desinfección de yemas de limón, donde se obtiene un valor aceptable de desinfección y la mayor supervivencia de los explantes.

4.2. Efecto del picloram a diferentes concentraciones en formación de callos a partir de cotiledones de limón criollo.

En la figura 6, se muestran callos obtenidos a partir de cotiledones con la adición de picloram. En el control (tratamiento 1) no se observó formación de callo. Se obtuvo una respuesta biológica muy similar en los 3 restantes tratamientos. La inducción de la callogénesis comenzó a los 15 días de cultivo, el callo comenzó su desarrollo de los bordes hacia el centro del explante.

Los callos fueron en la totalidad de los casos, nodulares, de consistencia dura. La coloración de los mismos fue entre color crema y blanco. Resultados similares se han obtenido por López –Báez (1993), en otras especies leñosas como el cacao, donde se describe también la formación de callos nodulares y de color amarillo-crema.

La callogénesis se manifestó independientemente de las concentraciones de picloram empleadas; obteniéndose un 100% de formación de callos en los tratamientos en que se aplicó picloram (datos no mostrados). Estos resultados son superiores a los alcanzados por Fajardo *et al.*, (2005) en aguacate, con la utilización del picloram en concentraciones de 0.6 μ M.

Estos resultados son también superiores a los obtenidos por López –Báez (1993), en cacao pero al utilizar combinaciones auxina/citoquinina de 3.0 mg.l-1 (2,4 D) + 0.25 mg.l-1 de kinetina. Además similares a lo obtenido por Ramila y Fajardo (2009) quienes describen una respuesta de 90% de formación de callos en el clon UF-613 con similares características.

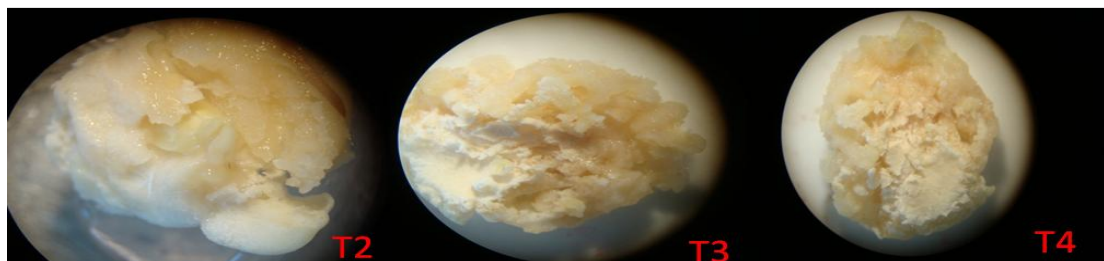
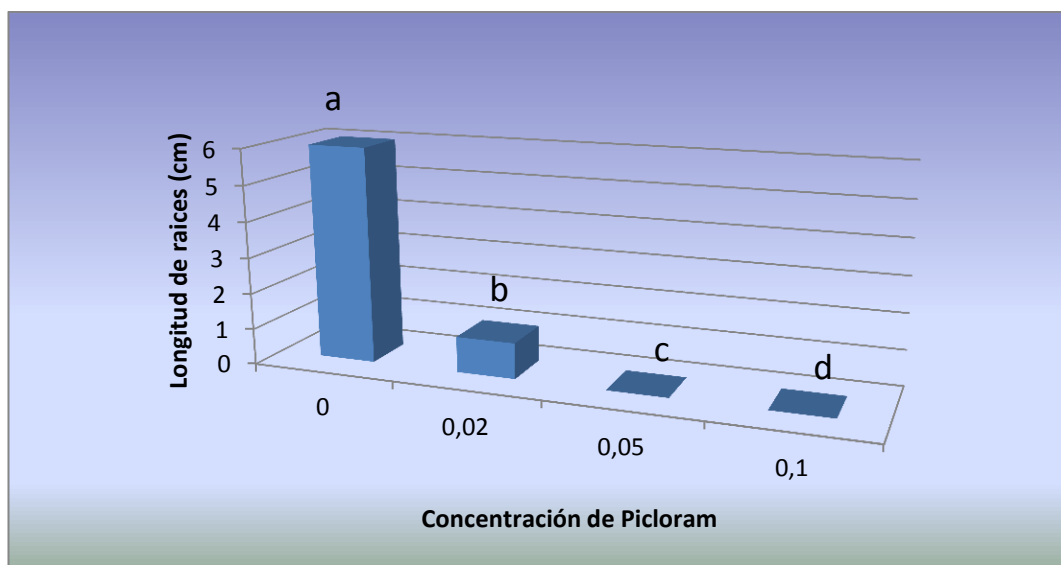


Figura 6. Callos obtenidos con adición de 4- amino-3,5,6- ácido trichloropicolínico). De Iz. a Der. Tratamientos 2, 3 y 4.

Los resultados muestran claramente que la adición de esta auxina sintética, aún a bajas concentraciones, promueve la formación de callos en este tipo de explante para el limón criollo y se mantiene esta respuesta biológica a las concentraciones mayores evaluadas.

A los 12 días de cultivo, se comenzaron a mostrar estructuras a manera de raíces, mayormente en el tratamiento 1 (cuando no se adicionó picloram al medio de cultivo). Luego se comprobó la rizogénesis típica de las dicotiledóneas y



Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Figura 7. Longitud de raíces obtenidas a partir de callos con adición de 4-amino-3,5,6- ácido tricloporicolínico.

Finalmente como resultado de este experimento se puede concluir que la acción del picloram a las concentraciones evaluadas promueve la callogénesis en cotiledones de limón. Pero su acción a partir de $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$, posterior al tiempo evaluado (30 días), sugiere estar dirigida más bien a una embriogénesis indirecta.

4.3. Efecto del 2,4-D a diferentes concentraciones en formación de callos y órganos a partir cotiledones de limón criollo.

A partir de los 7 días de cultivo, en los tratamientos donde se empleó 2,4-D, comenzó la germinación, la cual se identificó por la presencia del hipocótilo.

Como se muestra en la figura 8, el empleo de la menor concentración evaluada de 2,4-D ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) promovió el desarrollo de las raíces y la parte aérea, formándose una vitroplanta, además se formaron callos que emitieron raíces cortas directamente con la utilización de ese medio de cultivo. Por lo que se muestra que a la menor concentración, esta auxina promueve una respuesta biológica superior en cuanto a organogénesis directa y a partir de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ esta respuesta se ve inhibida y en su lugar se promueve una callogénesis (Figura 8, T3 y T4). Los callos fueron nodulares, de color amarillo-crema. Resultados similares a los obtenidos por Fioreet al., (2002) en diferentes variedades de

limón, pero utilizando como explantes estigmas quienes informan, después de la segunda semana de cultivo y utilizando 2, 4-D la formación de callos friables, de coloración amarillenta.

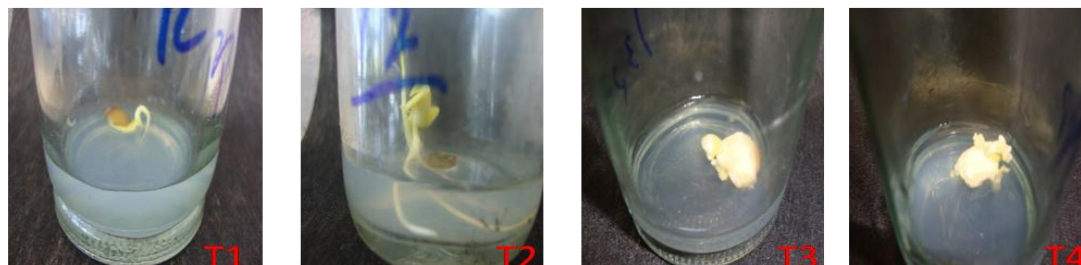


Figura 8. Estructuras obtenidas con adición de 2,4 ácido diclorofenoxiacético. De Iz. a Der. Tratamientos 1, 2, 3 y 4.

En la tabla 3, se muestran los resultados de formación de callos, brotes, hojas y raíces obtenidos con adición de 2,4-D. A mayor concentración de 2,4-D, se estimula la formación de callo y se inhibe el número de explantes con brotes, hojas y raíces. La respuesta biológica de estimulación de la organogénesis directa se obtuvo con la aplicación de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D. Tratamiento en que se obtuvo 44.4 % de brotes 33.3 % de hojas y un 55.5 % de raíces. Para esta última variable los resultados son similares a los obtenidos por Ramírez y Serrano (2004), quienes obtuvieron un 50 % de enraizamiento de brotes *in vitro* de *Swinglecitrumelo*.

A partir de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ la tendencia fue a la formación de callos, proceso directamente proporcional al aumento de la concentración de 2,4-D. A partir de los callos se forman raíces.

Estos resultados son similares a los obtenidos en otro limón (*Melissa officinalis*L.) por Mészáros, *et al.*, (1999) quienes lograron el establecimiento de brotes y la formación de raíces con $5.71 \mu\text{M}$ de AIA y $13.9 \mu\text{M}$ de kinetina.

Similares también a lo descrito por Olalla *et al.*, (2009) también en el limón, quien obtuvo retoños con raíces, pero utilizando varias combinaciones de auxinas obteniendo los mejores resultados con IBA.

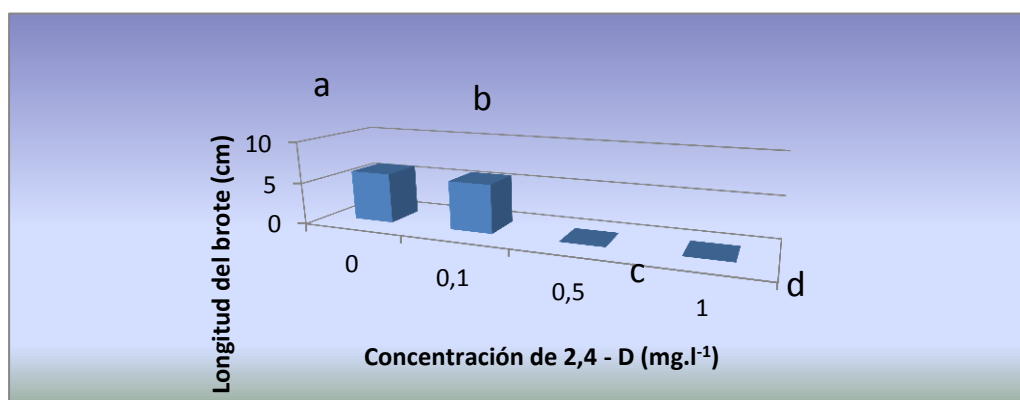
Tabla 3. Porcentajes de formación de callos, brotes, hojas y raíces obtenidos con adición de 2,4- ácido diclorofenoxiacético.

| Tratamientos | Callos Formados % | Explantes con Brotes % | Explantes con hojas % | Explantes con Raíces % |
|--------------|-------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| T1 | 0 ^b | 25 ^a | 12.5 ^{ab} | 50 ^a |
| T2 | 3.3 ^b | 44.4 ^a | 33.3 ^a | 55.5 ^a |
| T3 | 4 ^b | 0 ^b | 0 ^b | 20 ^{ab} |
| T4 | 50 ^a | 0 ^b | 0 ^b | 40 ^b |

Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Según Ramírez y Serrano (2004) en la etapa de enraizamiento, obtener un mayor número de raíces, aún de poca longitud, es de vital importancia en especies leñosas obtenidas de cultivo *in vitro*, para tener éxito en trasplante y adaptación a condiciones de invernadero.

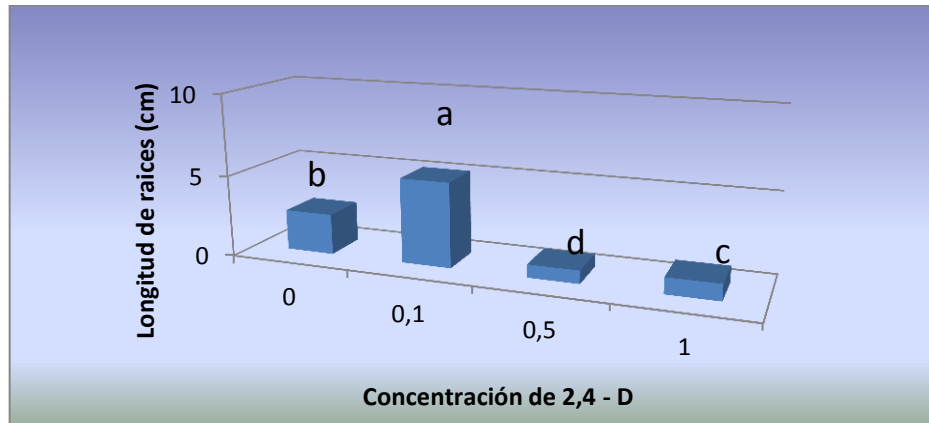
En las figuras 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a longitud de brotes y raíces, respectivamente. En los tratamientos donde se observó brotes y raíces, para ambas variables la respuesta biológica fue muy similar; alcanzándose los mejores resultados en el tratamiento control y al aplicar 0,1 mg.l⁻¹ de 2,4-D, siendo este último el mejor tratamiento. Para el cual se alcanzaron brotes de 7cm de longitud y raíces de 6cm. Resultados que evidencian el papel de esta auxina sobre el alargamiento celular (Vázquez y Torres, 1995) y SthefaníaFiore, 2002



Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Figura 9. Longitud de brotes obtenidos a partir de callos con adición de 2,4 ácido diclorofenoxiacético.

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Ramírez y Serrano (2004) al evaluar otros cítricos con la combinación hormonal (BAP 0.25 mg.l^{-1} + ANA 0.1 mg.l^{-1}) en cuanto a la longitud de brotes formados en el cultivo *in vitro* de Swinglecitrumelo y Cintrange carrizo.



Letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Figura 10. Longitud de raíces obtenidas a partir de callos con adición de 2,4 ácido diclorofenociacético.

Para los experimentos 2 y 3, los niveles de contaminación microbiana en los cotiledones establecidos, estuvieron dados mayormente por bacterias y en pocos casos por hongos (datos no mostrados). La contaminación se mostró en la generalidad de los casos del explante hacia el medio. Esto sugiere una contaminación bacteriana endógena. Lo cual se observó de forma general, independientemente del tratamiento empleado.

Finalmente a partir de los resultados obtenidos en este experimento se puede concluir que bajas concentraciones de 2,4-D (de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ o menores), son suficientes para estimular una organogénesis directa a partir de cotiledones de limón criollo, alcanzándose la máxima respuesta biológica entre $0,1$ y $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ aproximadamente. Ya que a partir de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ se forman sólo raíces.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró la desinfección y la mayor supervivencia. de yemas apicales de limón criollo con empleo de hipoclorito de sodio 1,0 % durante 20 minutos. Seguido de inmersión en bicloruro de mercurio al 0,1 % durante 10 minutos.
2. Se obtuvo un 100% de formación de callos con la adición de picloram al medio de cultivo, independientemente de la concentración de éste.
3. Con la aplicación de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D. Tratamiento en que se obtuvo 44.4% de brotes 33.3 % de hojas y un 55.5 % de raíces.
4. Bajas concentraciones de 2,4-D (de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ o menores), son suficientes para estimular una organogénesis directa a partir de cotiledones de limón criollo.

VI. RECOMENDACIONES

1. Estudiar otras concentraciones de picloram, evaluadas a partir de los 30 días, para comprobar su respuesta biológica.
2. Se recomienda para la organogénesis directa a partir de cotiledones, el uso del 2,4D.
3. Evaluar concentraciones menores de 0,1mg.l de 2,4D, en busca de la concentración óptima.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agramonte, D; Peñalver, F y Dita, M (1998) Aclimatización En: Pérez, JN (Ed) Propagación y Mejora de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas, santa Clara, Villa Clara, Cuba. p.193-205.
2. Aguilar, D; Agramonte, D; Gutiérrez, O; Barbón, R; Pérez, M; Collado,R y Jiménez, F. 2003. Propagación in vitro de explantes de teca, obtenidos a partir de semillas. Biotecnología Vegetal.Vol.3, No.3:161_167pp.
3. Al-Khayri, J.M. and A.M. Al-Bahray, 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia*(Lime). *Curr. Sci.*, 81: 1242–5.
4. Barbón, R (2003) Aspecto relacionado con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. Biotecnología Vegetal 3 (4): 211-221.
5. Barlass M, Skene KGM (1986) Citrus (Citrus species). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin, pp 207–219.
6. Barranco, LA (2001) Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos. En: Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara .p.8-15.

7. Benedito, V.A., A.M. Filho, M.J. Mendes, 2000. Callus induction, somatic embryogenesis and protoplast isolation from sweet orange varieties. *SciAgric. J.*, 57: 132–8.
8. Castillo, A. 2004 http://es.wikipedia.org/wiki/Micropropagaci%C3%B3n_de_Catalina_a_partir_de_embri%C3%B3nes_cig%C3%B3ticos_inmaduros.
9. Chung, P y Carrasco B (2000) Micropropagación de *Salix*spp. a través de meristemas foliares.[en línea] En: <<http://www.knauer.net> >[Consulta: 18 enero 2005].
10. Coello, M (1998) Inducción de callos y embriones en diferentes clones de cacao (*Theobroma cacao*. L). En: Trabajo de Diploma. p. 8-9.
11. CORPEI, 2005, WWW.corpei.com.ec Versión Digital(consultado: 12 enero del 2009).
12. Crozier, A (1981) Aspects of metabolism and physiology of gibberellins *Adu. Bot .Res.* 9: 33-148.
13. Del Río, J. A.; Marín, F. R.; Benavente, O.; Martínez, M.; García-Lidón, A.; Porras, I.; Ortuño, A. 1999. Caracterización de zumos de Citrus limon (var. Fino y Verna) en relación a su contenido en flavonoides, vitamina C y potencial antioxidante. *Levante Agrícola*, 38 (2): 193-197.
14. Delgado, FLA (2002) Micropropagación de *Eucalyptusgrandis* Hill ex Maiden a partir de segmentos nodales de árboles seleccionados. Tesis presentada en opción de al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de la Planta. UCLV. pp.53.

15. Deng, X.X., G.H. Yu and W.W. Guo, 2000. Somatic hybridization between diploids and allotetraploid somatic hybrids in *Citrus*. *9th ISC Congress Sun City Resort, South Africa*, 54: 115–21. different plant growth regulating compounds in in vitro shoot

16. Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L (2004) Establecimiento de cultivo de tejidos. *Biotecnología y Mejora Vegetal*. (Ed): INTA, Parte II Herramientas básicas. Buenos Aires, Argentina. 27-33.

17. FAO (1990) Sericulture training manual. FAO Agricultural Services Bulletin 80, Rome. p. 117.

18. Frank, M y Schmulling, T (1999) Cytokinin cycles cells. *Trends in Plant Sciences*, 4 (7):243-244.

19. Gamboa, VA y Núñez, LE (2001) Comportamiento de la propagación masiva del ñame en escala comercial .Trabajo de Diploma Universidad de Oriente.

20. García-Lidón, A., Del Río, J. A., Porras, I., Fuster, M. D. y Ortuño, A., 2003. El limón y sus componentes bioactivos. *Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente*. Murcia. pp: 127.

21. Gitarani, G.S.V. and N.A. Vinash, 2003. Callus induction and Plantlet regeneration in Sweet orange (*C. sinensis*L.) and Lime (*C. aurantifolia*). *In vitro Cell and Developmental Biol.*, 39: 468–74.

22. González, MC; Morejón, R y Portilla, M (2007) Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo *in vitro* de especies de *Coffea arabica* L. XII Congreso Científico del INCA. Programas y Resúmenes.

23. Hartmann, CH (1985) Propagación de plantas, principios y prácticas. Compañía Editorial Continental, M FAO 1988 Mulberrycultivation. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. Roma. México. 814 p.

24. Hossain, M; Rahmam, SM; Zaman, A; Joarder, OI and Islam, R (1992) Micropropagation of *Moruslaevigata* Wall. from mature trees. Plant Cell Rep.11:522-524.

25. ICFRE (2002) Mass Propagation Protocol For Bamboos. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding. Indian Council of Forestry Research and Education.12pp.

26. Jiménez, E (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez JN. (eds). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba .p. 45-46.

27. Kitto SL, Young MJ (1981) In vitro propagation of Carrizo citrange. HortScience 16:305–306

28. Kotsias D, Roussos PA (2001) An investigation on the effect of

29. Kulonow, A.M. 2002. Regeneration of West Indian Limes (*Citrus aurantifolia*) Containing genes for decreased seed set. *Acta Hort.*, 535: 151–7.

30. Lane WD (1978) Regeneration of apple plants from shoot meristem

31. Lillien Fajardo Rosaba, Marisol Freire Seijo, Yudith García Rodríguez, Leandris Argente Martínez. *Biotecnología Vegetal Vol. 5, No. 2: 103 - 107, abril - junio, 2005* Formación de embriones somáticos en *Persea americana* Millvar.

32. Lopez-Báez, O. 1993. Biotecnologías Aplicadas al Mejoramiento Genético y propagación de Cacao. Actas de la IX Reunión Científica, Tecnológica, Forestal y Agropecuaria. Mexico. Tabasco. Villa Hermosa. p 176-171.
33. Maceo, Y (2007) Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la *Curcuma longa*. En: Trabajo de Diploma. Centro de Estudio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. p. 9-10.
34. Marulanda, Marta; Gutiérrez LG y Márquez María del Pilar (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal, 27 (82) [en línea] En: <<http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/Vol27-82Resumen.htm>>[Consulta: 10 diciembre 2005].
35. Murashige, T y Skoog, F (1978) The impact plant tissue culture on agriculture. En: Thorpe, TA (ed) frontiers of plant tissue culture. University of Calgary. Canada. p. 15-26.
36. Orellana, P (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (ed.). Propagación y mejora genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. p. 151-178.
37. Paneque, O (2006) Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* L.) En: Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto nacional de Ciencias Agrícolas- Universidad de Granma.
38. Parrot, W (1993) Cell culture techniques: cell-culture, *in vitro* selection and somaclonal variation. En: Biotechnology applications for banana and

plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica) Proceeding. Montpellier, Francia. p.183 191.

39. Pelacho, A; Martín, L; Cueva, R; Sanfaliere, J; Badía, J y Alins G (2002) Cultivo *in vitro* (en línea) En [http://www.etsea.edl.es/in vitro/luz](http://www.etsea.edl.es/in_vitro/luz) (Consulta 12 diciembre 2005). Tissues of *Stylosanthesguianensis* (Aubl.) Sw. Scientia Agricola.58:759.
40. Pérez, J (2006) Embriogénesis somática en frijol tepary (*Phaseolusacutifolius* A. Gray cv. TB1). En: Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara. p. 15-18.
41. Pérez, JE y Gómez, R (1998) Field per formace (*Sacharumspp hybrids*) Mutantst. En: Somaclonal and induced mutation in crop improvement. SM jain D.S. Brar B.S. Ahloowalia (Eds) Dordrecht: Flower Academic Publishers. p. 425- 448.
42. Pérez, Olalla Tallón, I. Porras, 2009 Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.
43. Phillips, R. L former Associate Professor; S. Goldweber, former Extension Agent, Cooperative Extension Service; C. W. Campbell, Professor, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, 32611, 2008.
44. Radice, S (2004) Morfogénesis *in vitro*. Parte II Herramientas Básicas de la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. En: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejora Vegetal. (Ed): INTA, Buenos Aires, Argentina.p. 27-33.

45. Ramírez, M; Sierralta S y Urdaneta A (1999) Evaluation of surface disinfectants on the *in vitro* establishment of *Psidiumguajava* L. and *Psidiumfriedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. Plant Science, 156(2):125-135.

46. Sagarpa, 2004. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca Sistemas de Información Agropecuaria (SIACON). Internet.<http://www.sagarpa.gob.mx>.

47. Stefania Fiore, 2002 Fabio De Pasquale, Francesco Carimi, Maurizio Sajeval *Istituto di Ricerca per la Genetica degli Agrumi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, c/o Facolt`a di Agr* .Effect of 2,4-DD and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*.

48. Takahashi, T; Gasch A; Nishizawa, N y Chua, N (1995) The diminuto gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. Genes and Development.9:97-107. tips. PlantSciLett 13:281–285.

49. Trejo, G; Maldonado, U; Jiménez, A; Blanqueto, M; Salcedo, G; Martínez, P y De Jesús, A (2002) Reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz (*Oriza sativa* L. var. Japónica H 2005). Agrociencia.36:441-449.

50. Vázquez, E. y S. Torres 1995 Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación La Habana. P. 45.

51. Zayas, D (2005) Efecto de diferentes formulaciones de vitamina en la multiplicación *in vitro* del ñame (*Dioscoreaalata* L.).Trabajo de Diploma. p. 9 -11.

52. Ziv, M (1999) Plant propagation and mechanized separation of organogenic clusters from bioreactor culture. En: Taller Internacional de Biotecnología (BioVeg 99). CD-ROOM Bioplantás, Ciego de Ávila, Cuba.

ANEXOS

