




Artículo Original


**Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantium*.**

**Establishment and *in vitro* multiplication of *Citrus aurantium*.**

Dielis Rosabal Pérez. Especialista. Empresa Agropecuaria de Jiguaní, Granma, Cuba.  
[pdireccion1@citricosig.grm.minag.cu](mailto:pdireccion1@citricosig.grm.minag.cu) 

Marisel Bahí Arevich. Instructor. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Bayamo, Granma, Cuba. [mbahia@udg.co.cu](mailto:mbahia@udg.co.cu).  


Yanexis Yayma Fonseca Carrasco. Instructor. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Bayamo, Granma, Cuba.  
[yfonsecac@udg.co.cu](mailto:yfonsecac@udg.co.cu). 

Juan José Silva Pupo. Profesor Titular. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma. Bayamo, Granma, Cuba. [jsilvap@udg.co.cu](mailto:jsilvap@udg.co.cu)  


**Recibido:** 4 de marzo 2021 | **Aceptado:** 23 de junio 2021

**Resumen**

Los cítricos constituyen los frutales más cultivados y consumidos en el mundo. El objetivo de esta investigación fue determinar las condiciones para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de la especie *Citrus aurantium*. En un primer experimento se evaluó la desinfección de las semillas con el empleo de hipoclorito de sodio y bicloruro de mercurio como tratamientos de desinfección, obteniéndose un 100% de desinfección de las semillas con el hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos. En un segundo experimento se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg l<sup>-1</sup>) en el primer y segundo subcultivo de multiplicación. En el primer subcultivo los mejores resultados se lograron con BAP 1 mg l<sup>-1</sup> para el número de segmentos nodales con 8,13 segmentos nodales. En el segundo subcultivo los mejores resultados se lograron para los tratamientos con BAP 1; 0,5 mg l<sup>-1</sup> y el control sin BAP con valores entre 7,63 y 7,10 segmentos nodales.

**Palabras claves:** micropropagación; cultivo de tejidos; cítricos; naranja agria

## Abstract

Citrus fruits are the most cultivated and consumed fruit trees in the world. The objective of this research was to determine the conditions for the establishment and in vitro multiplication of the *Citrus aurantium* species. In a first experiment, the disinfection of the seeds was evaluated with the use of sodium hypochlorite and mercury bichloride as disinfection treatments, obtaining 100% disinfection of the seeds with 1% sodium hypochlorite for 20 minutes. In a second experiment, different concentrations of BAP (0; 0, 5; 1; 1, 5 and 2 mg l<sup>-1</sup>) were evaluated in the first and second multiplication subcultures. In the first subculture, the best results were achieved with BAP 1 mg l<sup>-1</sup> for the number of nodal segments with 8.13 nodal segments. In the second subculture, the best results were achieved for the treatments with BAP 1; 0, 5 mg l<sup>-1</sup> and the control without BAP with values between 7, 63 and 7, 10 nodal segments.

**Keywords:** micropropagation; tissue culture; citrus; sour orange

## Introducción

Los cítricos son uno de los cultivos frutales más importantes del mundo. La superficie dedicada a la producción de cítricos en 2018 totalizó 11,1 millones de hectáreas, con una enorme producción de naranjas de 75 millones de toneladas, seguida de clementinas, mandarinas y satsumas con 34 millones de toneladas, limones y limas con 19 millones de toneladas, y toronjas y pomelos con 9 millones de toneladas (FAO, 2018). Sin embargo, la industria mundial de los cítricos depende sustancialmente del monocultivo a gran escala y está amenazada por varias enfermedades de gran impacto económico en las principales zonas de producción, como China, Brasil, México, Estados Unidos y algunos países mediterráneos Poles, Licciardello, Distefano, Nicolosi, Gentile y La Malfa (2020).

Los cítricos son una de las frutas más populares del mundo. Representan una parte importante de nuestra dieta diaria no solo por el buen sabor, sino también por sus altos valores nutricionales y beneficios para la salud. Está bien establecido que el consumo de frutas cítricas reduce los riesgos de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, como cánceres, enfermedades cardiovasculares y diabetes. En estas frutas, se acumulan altas cantidades de compuestos bioactivos en la piel y la pulpa. Estudios recientes han documentado que los beneficios para la salud de los cítricos se deben en gran medida a los compuestos bioactivos como carotenoides, flavonoides y ácido ascórbico (vitamina C) en los frutos cítricos, incluyendo

## Establecimiento y multiplicación *in vitro*

su acumulación, mecanismos de metabolismo y beneficios para la salud Gang, Lancui, Minoru, Masaya (2020).

Según el Grupo Agrícola del Ministerio de la Agricultura (2020), Cuba contaba con un inventario de plantaciones de 11 mil 907 hectáreas de cítricos, de ellas, en producción 7 mil 419 hectáreas y en fomentos 4 mil 487 hectáreas. Dichas plantaciones presentaban, en ese momento, la siguiente composición por variedades: naranjas 3 mil 847 ha, toronja 5 mil 439 ha, limas y limones 2 mil 109 ha, otras 511 ha (mandarinas, naranja agria). El efecto de las plagas y enfermedades, y la insuficiencia de los insumos necesarios para la atención a las plantaciones, ha venido acelerando un decrecimiento en la producción de cítricos. El aseguramiento de la tecnología del cultivo en estos últimos años ha sido muy inestable, agravándose más en el 2020 que prácticamente no se ha podido acceder a financiamiento para garantizar la misma.

Los cítricos son uno de los principales cultivos a nivel mundial, pero su producción se ve reducida por diferentes tipos de estrés. La mejora de patrones de cítricos mediante métodos tradicionales se encuentra limitada por factores relacionados con su biología reproductiva. Como alternativa, el desarrollo de herramientas biotecnológicas como la mutagénesis, en combinación con el cultivo de tejidos, deberían ser consideradas como valiosas estrategias para abordar la mejora genética de estas especies (Tallon, 2016).

El cultivo de tejidos en los cítricos se aplica para la propagación *in vitro* mediante brotes axilares (Tallón *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2016) y embriogénesis somática, en el mejoramiento genético por hibridación somática o fusión de protoplasto (Pensabene, 2009), transformación genética, cultivo de anteras (Germana, Chiancone, Lain y Testolin, 2005) y en la conservación de germoplasma (Zhang, Xin, Xia, Guang, Juan, Dong, Xiao, 2017). La especie *Citrus aurantium* conocida como naranja agria ha sido la principal especie empleada como patrón en la propagación de los cítricos.

El objetivo de esta investigación fue determinar las condiciones para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de la especie *Citrus aurantium*.

### **Materiales y métodos**

#### Población y muestra.

La presente investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma en el período comprendido de junio de 2018 a diciembre de 2020.

Se tomaron frutos maduros de la especie *Citrus aurantium* de la empresa agropecuaria de Jiguaní, provincia Granma.

#### Medio y condiciones de cultivo

El medio de cultivo basal utilizado para la realización de los diferentes experimentos estuvo compuesto por las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup> y 6 g.L<sup>-1</sup> de agar E como agente gelificante y luego se ajustó el pH a 5,7 en un pH metro (Crison Basic 20) y las variaciones se regularon con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl). La gelificación del medio se realizó en planchas eléctricas y se distribuyó según el experimento.

La esterilización se realizó en autoclave vertical (BK-75) a 121°C de temperatura y 1,2 kgf.cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 minutos. Los medios de cultivo se mantuvieron en reposo tres días antes de su uso, para detectar cualquier tipo de contaminación. La manipulación del material vegetal y la siembra en los recipientes de cultivo se efectuó en la cabina de flujo laminar horizontal FASTER bajo condiciones asépticas empleando el alcohol etílico al 70% para la desinfección del área de siembra y las manos del operario.

Las condiciones de cultivo en las cámaras de crecimiento de luz solar fueron: temperatura entre 25 y 27°C; humedad relativa, 70-80%; intensidad luminosa de 60μE.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y duración del fotoperiodo, 12 horas luz.

Establecimiento *in vitro* mediante la desinfección de las semillas.

Los frutos se trasladaron al laboratorio del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal donde se procedió a su lavado con agua y detergente. Posteriormente se seccionaron a la mitad y sin dañar las semillas se lavaron de igual manera y fueron separadas en dos tratamientos para su desinfección.

Tratamiento 1: Hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos. Luego se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril y se escurrieron para su siembra *in vitro*.

Tratamiento 2: Bicloruro de mercurio al 0,1% durante 10 minutos. Luego se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril y se escurrieron para su siembra *in vitro*.

Las semillas se sembraron en el medio de cultivo con las sales y vitaminas Murashige-Skoog (1962), sacarosa 30 g/L, agar 6 g/L y un pH de 5,7; el que se distribuyó en tubos de ensayos de 15 cm de largo por 2 cm de ancho a razón de 10 mL de medio de cultivo por tubo de ensayo. La incubación se realizó a la oscuridad los primeros 10 días y posteriormente se colocaron en condiciones de luz natural.

Las variables evaluadas fueron:

## Establecimiento y multiplicación in vitro

- Porcentaje de semillas desinfectadas
- Porcentaje de semillas brotadas
- Número y longitud de los brotes
- Número de raíces
- Aparición de poliembrionía.

La primera variable se evaluó a los 10 días de cultivo y el resto a los 28 días de cultivo.

Multiplicación de brotes axilares obtenidos de semillas.

El objetivo de este experimento fue evaluar diferentes medios de cultivo con BAP en la multiplicación por segmentos nodales de la naranja agria.

El medio de cultivo basal utilizado en este experimento estuvo compuesto por con las sales y vitaminas de Murashige-Skoog (1962) al 100% de su composición, suplementadas con ácido giberélico  $1 \text{ mg. L}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ g.L}^{-1}$ , agar  $6 \text{ g.L}^{-1}$  y un pH de 5,7. Los medios de cultivo se agregaron en frascos de cristal de 20 x 50 mm, a razón de 10 mL por frasco.

Se utilizaron como explantes segmentos nodales obtenidos a partir de los brotes generados por los embriones cigóticos de la especie en cuestión. Los segmentos se seccionaron con una yema axilar y fueron sembrados a razón de un segmento nodal por frasco.

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Control sin BAP.
2. BAP  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$
3. BAP  $1 \text{ mg. L}^{-1}$
4. BAP  $1,5 \text{ mg. L}^{-1}$
5. BAP  $2 \text{ mg. L}^{-1}$

La incubación se efectuó en condiciones de cámara de cultivo de luz natural con una temperatura de  $25 \text{ C}^0$  durante los 28 días que duró el experimento.

Las variables fueron evaluadas a los 28 días:

- Porcentaje de brotación.
- Número de brotes.
- Número de segmentos nodales.
- Número de hojas.

Este esquema de medios de cultivo se utilizó para el primer y segundo subcultivo, donde los brotes y segmentos obtenidos en el primer subcultivo de multiplicación, una vez evaluados se

pasaron para un segundo subcultivo para idénticas condiciones de cultivo del anterior, evaluándose las mismas variables mencionadas.

#### Análisis estadísticos

Para los datos expresados en porcentaje tales como semillas desinfectadas, semillas brotadas y brotación se aplicó el análisis de comparación de proporciones con el paquete estadístico CompraPro según Castillo y Miranda (2014).

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado en cada uno de los experimentos realizados con análisis de varianza de clasificación simple, para las variables cuantitativas. Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro–Wilks y para la homogeneidad de varianza la prueba de Levene. Como prueba no paramétrica se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los casos se utilizó un intervalo de confianza  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico InfoStat Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Gonzalez, Tablada, Robledo, InfoStat (2010).

#### **Análisis de los resultados**

Establecimiento *in vitro* mediante la desinfección de las semillas.

La desinfección es un paso esencial en el establecimiento *in vitro* de las plántulas para el desarrollo de la micropropagación en cualquier especie. La desinfección resultó superior en el tratamiento con hipoclorito de sodio al 1% de cloro activo con el que se obtuvo un 100% de semillas desinfectadas (Figura 1) con diferencias significativas para el 5% según el análisis de comparación de proporciones con el tratamiento con bicloruro de mercurio empleado al 0,1% durante 10 minutos con el 80% de las semillas desinfectadas, lo que constituye un resultado muy satisfactorio ya que este último agente desinfectante es muy efectivo, pero a la vez es tóxico y puede afectar al operario en el flujo laminar. Los contaminantes fueron hongos del género *Aspergillus*, identificado por la coloración de su micelio y crecimiento filamentoso.

Hernández, Silva, Borges (2013). lograron la desinfección de las semillas de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. con el uso de hipoclorito de sodio al 1,0% durante 20 minutos. En ese tratamiento se alcanzó un 88% de supervivencia con 12% de contaminación microbiana con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos evaluados formados por diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de aplicación.

## Establecimiento y multiplicación in vitro

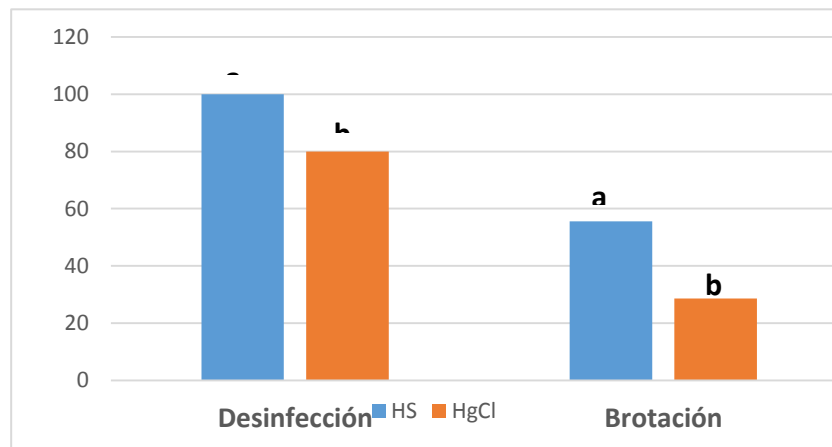


Figura 1. Respuesta de las semillas de *Citrus aurantium* a la desinfección y brotación.

La germinación de las semillas expresado en la brotación resultó superior en el tratamiento con hipoclorito de sodio al 1%, donde se alcanzó un 55% de respuesta con diferencias significativas para el 5% con el tratamiento con bicloruro de mercurio al 0,1% donde se obtuvo un 27%. Estos resultados muestran que el bicloruro de mercurio tuvo un efecto tóxico sobre la germinación de las semillas.

Al evaluar las variables número y longitud de los brotes y el número de raíces no se tuvo diferencias significativas entre ninguno de los dos tratamientos para las tres variables estudiadas (tabla 1). El número de brotes respondió al patrón de la arquitectura de una planta leñosa al presentarse un brote principal, aunque en algunas semillas se observó la presencia de la poliembrionía que es una característica de las especies del género *Citrus*. Hernández *et al.* (2013) también observó la presencia de brotes múltiples en semillas de *Citrus aurantifolia* debido a la poliembrionía.

Para la longitud de los brotes los valores alcanzados fueron similares, demostrándose que el medio de cultivo con las sales Murashige (1962) y sacarosa favorecieron el crecimiento del brote principal sin la necesidad de incorporar reguladores del crecimiento.

Tabla 1. Efecto de los agentes desinfectantes en el número y longitud de los brotes y el número de raíces.

Tratamientos	Número de brotes	Longitud de los brotes (cm)	Número de raíces
Bicloruro de mercurio	1,2	3,66	1,2
Hipoclorito de sodio	1,05	3,93	1,5
$p \leq 0,05$	n.s.	n.s.	n.s.

Legenda: n.s: no significativa.

El número de raíces también fue muy similar en ambos tratamientos por ser este cultivo leñoso emite una raíz principal, con escasas raíces secundarias que se pueden observar a los 28 días de cultivo. En la figura 2 se muestra el crecimiento y desarrollo de una plántula obtenida a partir de las semillas en el tratamiento donde se empleó hipoclorito de sodio al 1% de cloro activo. Estas muestran la presencia de dos raíces, un brote, las hojas cotiledonales y las hojas incipientes en desarrollo. En su alargamiento se observan también la presencia de segmentos nodales, los que se utilizarían en la etapa de multiplicación.



**Figura 2. Plántula obtenida con la germinación de la semilla de *Citrus aurantium* desinfectada con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos.**

El cultivo de semillas es una técnica de interés para el rescate de embriones cigóticos obtenidos de cruzamientos interespecíficos. En un estudio de 27 cultivares de limón (*Citrus limon*) observaron que la poliembriónía es leve o moderada, con un 25 a 43% de semillas poliembriónicas y de 1,3 a 1,6 embriones por semilla. Sobre esta base, es necesario rescatar los embriones cigóticos en un estadio inmaduro etapa. El rescate y el desarrollo de embriones *in vitro* han ha sido estudiado en dos cultivares *Citrus limon* poliembriionario. La respuesta no fue influenciada por la concentración de sacarosa de 50 y 70 gramos por litro y el medio de cultivo de Gamborg B5 resultó superior al medio Murashige, Pérez y Porras (2017).

Multiplicación de brotes axilares obtenidos de semillas.

Primer subcultivo.

En la multiplicación de brotes axilares obtenidos de semillas en diferentes concentraciones de BAP en el primer y segundo subcultivo no hubo diferencia significativa en la brotación de los segmentos nodales al presentar todos los explantes una respuesta del 100%.



## Establecimiento y multiplicación in vitro

Para el número de brotes en los diferentes tratamientos con BAP no hubo diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, la respuesta estuvo entre 2,00 brotes en el control sin BAP hasta 3,06 brotes en el medio de cultivo con BAP 1 mg. L<sup>-1</sup>. En la variable número de segmentos nodales la respuesta fue superior en el medio de cultivo con BAP 1 mg. L<sup>-1</sup> con 8,13 segmentos nodales con diferencias significativas en relación al resto de los demás tratamientos sin diferencias significativas entre ellos (tabla 2).

El número de hojas fue superior en el medio de cultivo BAP 1 mg. L<sup>-1</sup> con 8,38 hojas promedio sin diferencias significativas con los medios de cultivo de BAP 0,5 mg. L<sup>-1</sup> y el control sin BAP. En la base de la inserción de la hoja con el tallo debe existir una yema que permita su utilización para la multiplicación de las plantas. En todos los tratamientos existe un ligero incremento del número de hojas en relación al número de segmentos nodales, esas diferencias pueden deberse a que existen hojas muy pequeñas, donde es difícil contabilizar como un segmento nodal debido a su cercanía con otra hoja.

**Tabla 2. Resultados en el número de brotes, segmentos nodales y de las hojas en diferentes medios de cultivo en el primer subcultivo de multiplicación.**

Tratamientos	BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	Número de brotes	Número de segmentos nodales	Número de hojas
1	0	2,00	5,88 b	7,75 a
2	0,5	2,38	5,00 b	6,19 ab
3	1,0	3,06	8,13 a	8,38 a
4	1,5	3,00	5,00 b	5,17 b
5	2,0	2,40	4,80 b	4,88 b
p≤0,05	--	n.s.	*	*

Leyenda: n.s: no significativa. \*: significación para p≤0,05.

### Segundo subcultivo

De manera similar al primer subcultivo para la variable número de brotes no se obtuvo diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos con BAP, la respuesta osciló de 2,00 brotes en el medio de cultivo sin BAP hasta 3,06 en el medio de cultivo con BAP 1 mg. L<sup>-1</sup>. Para la variable número de segmentos nodales la respuesta fue superior en los medios de cultivo con BAP 0,5 y 1 mg. L<sup>-1</sup> y el control sin diferencias significativas entre esos tratamientos con valores entre 7,63 y 7,10 segmentos nodales (tabla 3).

El número de hojas fue superior en los tratamientos control 9,40 y BAP 0,5 mg. L<sup>-1</sup> con 6,00 hojas sin diferencias significativas entre ellos. En esta variable se observa que existe una tendencia que a medida que se incrementan las concentraciones de BAP, disminuye el número de hojas.

**Tabla 3. Resultados en el número de brotes, segmentos nodales y de las hojas en diferentes medios de cultivo en el segundo subcultivo de multiplicación.**

Tratamientos	BAP (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Número de brotes	Número de segmentos nodales	Número de hojas
1	0	2,80	7,60 a	9,40 a
2	0,5	3,80	7,10 a	6,00 a
3	1,0	2,88	7,63 a	5,25 b
4	1,5	1,73	2,36 c	3,09 b
5	2,0	2,88	5,06 b	3,38 b
p≤0,05		n.s.	*	*

Leyenda: n.s: no significativa. \*: significación para el 5%.

En estudios realizados para la propagación *in vitro* de las especies utilizadas como patrón en el cultivo de los cítricos mandarina Cleopatra, lima Rangpur, citrange Troyer, *Citrus volkamariana* y naranja agria encontraron que el mejor medio de cultivo para la multiplicación fue la combinación de BAP (1,5 mg. L<sup>-1</sup>) +Kinetina (1 mg. L<sup>-1</sup>) superior al medio de cultivo con BAP y kinetina solas cuando emplearon como explantes segmentos de epicótilo, similar a los utilizados en este experimento. Para la naranja agria obtuvieron un número de hojas de 11.40 cuando combinaron BAP+kinetina. En ese mismo tratamiento y tipo de explante el número de brotes fue de 9,2 El-Boray, Mustafa, Shalan y Abed (2015)

Se muestra el crecimiento en longitud del brote con la emisión de hojas verdes y en los segmentos nodales basales se observa la emisión de pequeños nuevos brotes con hojas, demostrándose la capacidad de los explantes para la multiplicación *in vitro* a los 60 días de cultivo en el medio de cultivo con BAP 0,5 mg. L<sup>-1</sup> y 1 mg. L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (Figura 3).

## Establecimiento y multiplicación in vitro



BAP 0,5 mg.l<sup>-1</sup>

Figura 3. Brotes axilares obtenidos en el segundo subcultivo en el medio de cultivo con BAP 0,5 mg. L<sup>-1</sup>.

Tallón, Córdoba, Porrás, Pérez (2015). estudiaron la influencia de varios medios basales y reguladores del crecimiento de las plantas en la micropropagación eficiente de explantes nodales de árboles maduros de portainjertos de cítricos alemow, naranja agria y mandarina 'Cleopatra'. Los tres cultivos de brotes de portainjertos de cítricos mostraron preferencia por los medios con alto contenido de sal, como el medio Murashige y Skoog o Driver y Kuniyuki. En la fase de proliferación de brotes las combinaciones de BAP y ácido giberélico mejoraron la proliferación de todos los patrones estudiados. La adición de BAP y adenina al medio de cultivo mejoró la proliferación de brotes en la naranja agria y la mandarina "Cleopatra" de la misma manera que BAP y ácido giberélico. La adición de diferentes combinaciones de BAP y kinetina no resultó en una mejora adicional de ninguna de las variables estudiadas.

### Conclusiones

1. Se logró el establecimiento *in vitro* de semillas de *Citrus aurantifolia* desinfectadas en un 100% con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos.
2. Se obtuvo la multiplicación de segmentos nodales en el primer y segundo subcultivo en los medios de cultivo con BAP y ácido giberélico con la formación de nuevos segmentos nodales.

### Referencias bibliográficas

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión (2010). *Grupo InfoStat, FCA*, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- El-Boray, S.; Mustafa, M. Shalan, A. y Abed A. A. (2015) *In vitro propagation of some citrus rootstocks. Effect of explant source and growing media growth regulators content. J. Plant Production, Mansoura Univ., and Vol. 6 (6): 915 – 925.*
- FAO (2018). FAOSTAT Database Results. Available online: <http://www.fao.org/faostat/> (accessed on 5 April 2020).
- Gang M., Lancui Z., Minoru S., Masaya K. (2020). *Citrus and health*. En: The Genus Citrus\_2020. P 495-511.
- Germana M., Chiancone, B., Lain, O., y Testolin, R. (2005). Another culture in *Citrus clementina*: a way to regenerate tri-haploids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, p 839–845.
- Grupo Agrícola del Ministerio de la Agricultura de Cuba (2020). *Análisis del comportamiento del Programa de Cítricos y Frutales durante 2020*. [https://www.minag.gob.cu/node/3189\\_28 de enero 21](https://www.minag.gob.cu/node/3189_28_de_enero_21)
- Hernández, Y., Silva, J.J., Borges, M. (2013). *Establecimiento y multiplicación in vitro de Citrus aurantifolia Christm. Swing. var. `mexicana' a partir de semillas*. *Biología Vegetal* Vol. 13, No. 3: 181 - 187, julio – septiembre.
- Zhang, J.M., Xin, L., Xia X., Guang, Y., Juan H., B., Dong J., Xiao, C. (2017). *Cryopreservation of Citrus anthers in the National Crop Genebank of China*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*. 53:318–327.
- Murashige, T., & Skoog, F. A (1962). *Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant*, 15, 473-497,
- Navarro, N., Morte, A., Pérez, O. (2016). *In vitro adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of Citrus limon*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*. DOI 10.1007/s11627-015-9743-4
- Pensabene, G. (2009). *Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española*. Tesis doctoral en la Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Perez, O. y Porras, I. (2017). *Assessment of polyembryony in lemon: rescue and in vitro culture of immature embryos*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* · May 2008. DOI 10.1007/s11240-008-9358-0
- Poles, L., Licciardello, C., Distefano, G., Nicolosi, E., Gentile, A., y La Malfa, S. (2020). *Recent Advances of In Vitro Culture for the Application of New Breeding Techniques in Citrus*. *Plants* 2020, 9, 938; doi:10.3390/plants9080938.

## Establecimiento y multiplicación in vitro

Tallón, C., Córdoba, F.; Porras, I., Pérez, O. (2015). *Efficient in vitro propagation and rooting of adult explants of citrus rootstocks*. ISHS Acta Horticulturae 1065: XII International Citrus Congress - International Society of Citriculture [10.17660/ActaHortic.1065.81](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1065.81)

Tallon, C.I. (2016). *Bioteconología aplicada a la mejora genética de patrones de cítricos: puesta a punto de un protocolo de micropropagación y regeneración adventicia para su utilización en la generación de líneas mutantes tolerantes a la salinidad*. Tesis de doctorado. En: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/47721> (17 de marzo 2021).