

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Micropropagación *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) a partir de segmentos nodales

In vitro micropropagation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) from nodal segments

Angel David Hernández-Amasifuen, Alexandra Jherina Pineda-Lázaro*, Hermila Belba Díaz-Pillasca

DOI. 10.21931/RB/2021.06.04.13

Resumen: La naranja agria (*Citrus aurantium* L.) presenta un alto valor nutricional y gastronómico en el distrito de Huacho, Lima, Perú, pero en la actualidad se considera una especie en peligro de desaparecer del distrito y alrededores por problemas fitosanitarios. Para la recuperación y repoblación de esta especie se planteó emplear técnicas biotecnológicas para la obtención de plantas libres de patógenos. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue micropropagar *in vitro* naranja agria a partir de segmentos nodales. Los segmentos nodales de naranja agria fueron desinfectados en diferentes concentraciones de NaClO, luego se introdujeron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) adicionado con BAP, KIN y AG3 para la fase de multiplicación, posteriormente se transfirieron a medios MS adicionado con IBA y ANA para la fase de enraizamiento. La evaluación del porcentaje de contaminación se realizó a los diez días, la evaluación de formación de brotes en fase de multiplicación se realizó a los 30 días y la evaluación de enraizamiento a los 30 días. En la fase de desinfección y establecimiento *in vitro* se logró obtener 0% de contaminación y 0% de oxidación de los explantes. En la fase de multiplicación *in vitro* los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo M8 generando 4,7 brotes por explante. Y finalmente en la fase de enraizamiento el medio E4 permitió obtener 94,7% de explantes enraizados, 23,4 mm de longitud de raíz y 2,2 raíces por explante.

Palabras clave: Desinfección, establecimiento, multiplicación, biotecnología, Huacho.

Abstract: Sour orange (*Citrus aurantium* L.) has a high nutritional and gastronomic value in Huacho, Lima, Peru, but is currently considered a species in danger of disappearing from the district and surrounding areas due to phytosanitary problems. For the recovery and repopulation of this species, biotechnological techniques were proposed to obtain pathogen-free plants. Therefore, the objective of the present research was to micro propagate sour orange *in vitro* from nodal segments. Sour orange nodal segments were disinfected in different concentrations of NaClO, then placed in MS culture medium (Murashige and Skoog) supplemented with BAP, KIN, and AG3 for the multiplication phase, and then transferred to MS medium supplemented with IBA and ANA for the rooting phase. The evaluation of the percentage of contamination was carried out after 10 days, the evaluation of shoot formation in the multiplication phase was carried out after 30 days, and the evaluation of rooting after 30 days. In the disinfection and *in vitro* establishment phase, 0% contamination and 0% oxidation of the explants were obtained. In the *in vitro* multiplication phase, the best results were obtained in the M8 culture medium, generating 4.7 shoots per explant. Finally, the E4 medium yielded 94.7% of rooted explants, 23.4 mm root length, and 2.2 roots per explant.

Key words: Disinfection, establishment, multiplication, biotechnology, Huacho.

Introducción

Los cítricos (*Citrus*) son un importante género de árboles frutales por presentar un alto valor nutricional y económico, encontrándose ampliamente distribuido por todo el mundo debido a su gran consumo^{1,2}. Con una producción de 124 millones de toneladas en promedio anualmente a nivel mundial, mientras que en Perú solo se llega a producir un millón de toneladas, de los cuales alrededor del 40% es producido por naranjas^{3,4}.

Dentro de las naranjas que produce el país se tiene a la naranja agria o amarga (*Citrus aurantium* L.), la cual es utilizada en la gastronomía, como saborizante, en la medicina natural y como portainjerto de gran número de especies de valor comercial, por presentar resistencia a condiciones abióticas como salinidad y sequía, además de ser tolerante a fitopatógenos como *Armillaria mellea* y *Phitophthora* sp.⁵. Es así como se puede encontrar a la naranja agria dentro de la biodiversidad vegetal del distrito de Huacho, Provincia de Huaura, Departamento de Lima. La cual es utilizada como insumo para muchos platos típicos de la zona como el ceviche de pato y ceviche de pescado, pero actualmente su producción es esca-

sa, al punto de encontrar números reducidos de estos árboles frutales por lo que esta próxima de desaparecer del distrito y sus alrededores^{6,7}, esto debido a ser susceptible al virus de la tristeza de los cítricos (CTV), ocasionando escasa longevidad de las plantas, bajos rendimientos y deficiencias de calidad de la fruta^{8,9}, y además la preferencia de los agricultores locales a otros cultivos de mayor demanda económica^{10,11}.

Considerando a la naranja agria como una planta de gran importancia gastronómica a nivel local y nacional, se busca estrategias para la recuperación y repoblación de esta especie. En la actualidad se pueden aplicar herramientas de biotecnología vegetal, como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales^{12,13}. Resultando en clones uniformes a partir de una planta madre libre de enfermedades y de gran producción, conservando y garantizando los rasgos seleccionados¹⁴. Además, la propagación *in vitro* permite obtener material vegetal durante todo el año, de esta manera no habría un limitante como el suministro de semilla o plantines de invernaderos^{15,16}.

Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Huacho, Perú

Corresponding author: sherina.97.19@gmail.com

En tal sentido las aplicaciones de los cultivos *in vitro* no solo se limitan a las altas tasas de multiplicación como método de propagación asexual para la producción de plantas clonales, sino que también forma la base para gran variedad de estudios en la mejora genética vegetal¹⁷. Es así como se han reportado investigaciones en el cultivo *in vitro* de cítricos, donde se ha evaluado las diferentes respuestas morfogénicas influenciadas por la especie, tipo de explante y la composición del medio de cultivo^{18,19}. Iniciando desde el establecimiento *in vitro* de semillas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L.) y su posterior multiplicación a partir de segmentos maduros del tallo²⁰. De la misma manera²¹, trabajaron inicialmente con semillas de naranja agria y lima (*Citrus aurantifolia*) respectivamente, para luego multiplicar a las plántulas germinadas empleando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento²², trabajo con semillas de naranja y con varetas de limón, logrando establecer *in vitro* a ambas especies para realizar microinjertos, evaluando la influencia de las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo²³, realizaron experiencias con yemas de limón criollo (*Citrus limon*), para la formación de callos y brotes empleando picloram y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)²⁴, trabajaron en la micropropagación de limón a partir de segmentos nodales²⁵, evaluó el efecto de las citoquininas 6-Bencilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en la propagación *in vitro* de lima (*Citrus aurantifolia*) a partir de segmentos nodales. 26, establecieron un protocolo de micropropagación de citrumelo "Swingle" a partir de segmentos nodales, y lograron obtener tasas aceptables de multiplicación²⁷, evaluaron varias concentraciones de reguladores de crecimiento (citoquininas, auxinas y ácido giberélico) en el medio de cultivo MS para inducir la formación de brotes a partir de segmentos nodales de naranja agria y mandarina.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue lograr la micropropagación *in vitro* de naranja agria a partir de segmentos nodales, estableciendo un protocolo óptimo de propagación efectiva para la obtención de una fuente ideal de material aséptico y homogéneo para usar en programas de mejoramiento genético vegetal.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela Profesional de Biología con mención en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Na-

cional José Faustino Sánchez Carrión, en el distrito de Huacho, provincia de Huaura, departamento de Lima, Perú.

Material vegetal

Se emplearon segmentos nodales de naranja agria procedentes del vivero que pertenece al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, ubicada en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión; situado a una altitud de 41 msnm, latitud sur 11° 7' 34" y longitud oeste 77° 36' 34", con temperatura media anual de 19,2° C.

Desinfección y establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

Los segmentos nodales fueron llevados a laboratorio donde se lavaron con agua destilada durante 5 minutos y se continuo se inició con el proceso de desinfección. Se trasladaron a cámara de flujo laminar y se sumergieron en etanol al 70 % durante 1 minuto, después fueron sumergidos durante 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, seguido se sometieron a cuatro tratamientos con variaciones en las concentraciones de hipoclorito de sodio: 1% (T1), 1,5% (T2), 2% (T3) y 2,5% (T4) durante 10 minutos cada uno en agitación continua y luego se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio, seguido los segmentos nodales se cortaron por la parte inferior y superior hasta tener un explante de aproximadamente 1.5 cm de longitud. Finalmente fueron introducidos *in vitro* en tubos con medio de cultivo MS²⁶ a la mitad de su concentración, adicionado con 6 g/L de agar, 15 g/L de sacarosa y pH a 5,7. El medio de cultivo empleado fue previamente esterilizado en autoclave a 1,2 Bar de presión y una temperatura de 121° C durante 20 minutos.

Multiplicación *in vitro*

A los 30 días se realizaron cortes para obtener nuevamente segmentos nodales, los cuales fueron cultivados *in vitro* en el medio de cultivo MS suplementado con reguladores de crecimiento en diferentes tratamientos (Tabla 1). El medio de cultivo fue preparado con sales y vitaminas del medio de cultivo MS adicionado con 7 g/L de agar, 23 g/L de sacarosa y se ajustó el pH a 5,7. El medio de cultivo fue dispensado en 10 mL por frasco y luego se sellaron con papel aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 1,2 Bar de presión y una temperatura de 121° C durante 20 minutos.

Tratamiento	KIN (mg/L)	BAP (mg/L)	AG ₃ (mg/L)
M1	0	0	0
M2	0,25	0	0
M3	0	0,25	0
M4	0	0	0,25
M5	0,25	0,25	0
M6	0,25	0	0,25
M7	0	0,25	0,25
M8	0,25	0,25	0,25

Tabla 1. Combinación de los reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.).

KIN = Kinetina; BAP = 6-Bencilaminopurina; AG₃ = Ácido Giberélico.

Enraizamiento *in vitro*

Transcurrido 30 días los explantes fueron transferidos a frascos que contenían medio de cultivo MS suplementado con auxinas en distintos tratamientos (Tabla 2). El medio de cultivo fue preparado con las sales y vitaminas del medio de cultivo MS adicionado con 7 g/L de agar, 23 g/L de sacarosa y se ajustó el pH a 5,7. El medio de cultivo fue dispensado en 10 mL por frasco y luego se sellaron con papel aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 1,2 Bar de presión y una temperatura de 121° C durante 20 minutos.

En las tres etapas de evaluación (desinfección e introducción, multiplicación y enraizamiento) los explantes fueron incubados durante 30 días a una temperatura constante de 27° C, con humedad relativa del 75±2% y fotoperiodo de 16 horas luz con intensidad lumínica de 1500 Lux. (Plant Growth Chamber, LGC – 5201 G, LabTech)

Tratamiento	IBA (mg/L)	ANA (mg/L)
E1	0	0
E2	1	0
E3	0	1
E4	1	1

IBA = Ácido Indol Butírico; ANA = Ácido naftalenacético

Tabla 2. Combinación de las auxinas para el enraizamiento *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.).

Diseño experimental, variables medidas y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar con 10 frascos por tratamiento, cada frasco contenía un explante como unidad experimental y el mismo se repitió tres veces. En la fase de desinfección e introducción se evaluó el porcentaje de contaminación, la oxidación de los explantes y la sobrevivencia, en la fase de multiplicación se evaluó el número de brotes, longitud de los brotes, número de nudos y número de hojas por explante y finalmente en la fase de enraizamiento se evaluó el porcentaje de explantes enraizados, longitud de la raíz y número de raíces. Los datos se procesaron mediante Análisis de Varianza (ANVA) con los paquetes estadísticos agricolae y car del programa libre R (versión 4.1.0 para Windows), y la comparación entre las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	NaClO (%)	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Sobrevivencia (%)
T1	1	35 a	0 b	65 b
T2	1,5	0 b	0 b	100 a
T3	2	0 b	0 b	100 a
T4	2,5	0 b	52 a	48 c

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$.

Tabla 3. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de los segmentos nodales de naranja agria (*Citrus aurantium* L.).

Resultados

Desinfección y establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

La evaluación de la desinfección superficial de los segmentos nodales se realizó a los diez días después de realizada la introducción *in vitro*. La Tabla 3 muestra 0% de contaminación en los tratamientos T2, T3 y T4. La diferencia entre estos tratamientos se evidenció en el porcentaje de oxidación de los segmentos nodales, obteniéndose 0% de oxidación en los tratamientos T2 y T3.

Multiplicación *in vitro*

La evaluación de los brotes se realizó a los 30 días de cultivo (Figura 1). En la Tabla 4 los resultados indicaron la influencia de combinar dos citoquininas (BAP y KIN) y AG3 en el tratamiento M8 lo que permitió obtener un mayor número de brotes (Figura 2). En el tratamiento M4 se obtuvo un promedio de longitud mayor a los demás tratamientos (Figura 3), mientras que en el promedio de número de nudos los tratamientos M4 y M6 fueron los que no presentaron diferencia significativa, y finalmente para el promedio de número de hojas los tratamientos M3 y M5 fueron los que presentaron los valores más altos, pero no difiriendo significativamente entre ellos.

Enraizamiento *in vitro*

La evaluación del enraizamiento se realizó a los 30 días de cultivo (Tabla 5), alcanzado los mejores resultados en el tratamiento E3 compuesto por el medio MS adicionado con 1 mg/L de IBA y 1 mg/L de ANA.

Discusión

Los tratamientos de desinfección de los segmentos nodales de naranja agria procedentes del invernadero permitieron su establecimiento en condiciones *in vitro*. Con las concentraciones de 1,5% (T2) y 2% (T3) de NaClO se obtuvieron explantes con 0% de contaminación y oxidación, por lo cual se les considera los mejores tratamientos. La desinfección del material vegetal en la presente investigación se inició con etanol al 70% y se continuo con soluciones de hipoclorito de sodio, es de gran importancia en la desinfección superficial de los explantes emplear etanol para eliminar contaminantes bacterianos y para los contaminantes fúngicos determinar concentraciones adecuadas de hipoclorito de sodio para no dañar el material vegetal²⁹.

Tratamiento	Promedio de N° de brotes por explante	Promedio de longitud de brotes (mm)	Promedio de N° de nudos por explante	Promedio de N° de hojas por explante
M1	1,3 d	17,7 d	1,2 d	5,4 b
M2	3,3 b	27,6 c	1,6 d	5,7 b
M3	2 c	37,4 b	3,4 b	6,5 a
M4	1,6 cd	46,6 a	4,5 a	5,6 b
M5	2,2 c	33,1 b	3,2 b	6,2 a
M6	2,4 c	30,4 bc	4,3 a	3,8 d
M7	1 d	36,8 b	3,1 b	5,2 c
M8	4,7 a	29,4 bc	2,3 c	4,1 d

Tabla 4. Efecto de los reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.).

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$.

Tratamiento	Explantes enraizados (%)	Promedio de longitud de raíces (mm)	Promedio de N° de raíces por explante
E1	0 d	0 c	0 c
E2	22,3 c	26,6 a	1,3 b
E3	66,8 b	13,7 b	1,2 b
E4	94,7 a	23,4 a	2,2 a

Tabla 5. Efecto en la combinación de las auxinas para el enraizamiento *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.).

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$.



Figura 1. Plántulas *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.), a los 30 días de cultivo en la etapa de multiplicación.

En la fase de desinfección y establecimiento *in vitro*, los tratamientos utilizados en la presente investigación presentan mejores resultados en comparación de otros autores que han trabajado con especies del mismo género, como (25), que utilizó hipoclorito de sodio al 0,6% durante 15 minutos para la desinfección de segmentos nodales de *Citrus aurantiifolia*, logrando un porcentaje de contaminación del 56%. Mientras que (23), lograron porcentajes de contaminación del 0% al emplear hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos, pero además los autores utilizaron un segundo lavado transcurrida las 24 horas y adicionalmente los sumergió por una solución de sulfato de cobre al 2% en la desinfección de yemas apicales de *Citrus limon*.

En la multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales de naranja agria el tratamiento con medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L KIN, 0,25 mg/L BAP y 0,25 mg/L AG3 permitió obtener el mayor número de brotes con 4,7 brotes por explante. Este resultado está en relación a la adición de los tres reguladores de crecimiento, mientras que en los demás tratamientos que se adicionaron dos reguladores de crecimiento se vieron significativamente afectados en la disminución del número de brotes por explante en comparación a los tratamientos donde solo se adiciono un regulador de crecimiento, coincidiendo con (26), quienes obtuvieron una disminución en la formación de brotes de citrumelo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus paradisi* McFaden) con tratamientos adicionando BAP y KIN, en comparación donde solo utilizaron BAP. Resultados similares obtuvo (25) quien no encontró diferencia significativa en el uso de BAP asociado con KIN que al utilizar únicamente BAP. Mientras que (27) emplearon un medio de cultivo MS suplementado con 2 mg/L de BAP y 0,6 mg/L de AG3 para la formación de brotes de naranja agria, donde obtuvieron dos



Figura 2. Efecto de la combinación de BAP, KIN y AG3 en el cultivo *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.), a los 30 días de cultivo.



Figura 3. Efecto del AG3 en el cultivo *in vitro* de naranja agria (*Citrus aurantium* L.), a los 30 días de cultivo.

brotos por segmento nodal, resultado muy cercano al obtenido con el tratamiento M6 en la presente investigación.

El tratamiento M4 fue el que presentó mayor longitud de los brotes con 46.6 mm, esto es debido a que este medio de cultivo solo estaba suplementado con AG3. (30) señalan que en *Citrus* se utiliza generalmente AG3 para aumentar la longitud de los brotes. Pero al adicionar AG a los demás tratamientos con BAP y KIN no tuvo mayor efecto en la longitud de los brotes que en los tratamientos donde solo se adicionó una de las citoquininas. Estos resultados guardan relación con estudios realizados en evaluación del uso de BAP en adición con AG3 en *Citrus aurantium*²⁷ y *Citrus limon*³¹, donde concluyeron que no había diferencia significativa en comparación con los resultados obtenidos con los tratamientos donde solo se adicionó BAP en el medio de cultivo.

El mayor número de hojas se logró obtener con el medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L de KIN, con un promedio de 6,5 hojas por explante. Este resultado coincide con (23), quienes obtuvieron 6 hojas en promedio por brote al utilizar el medio MS adicionado con 0,25 mg/L de KIN. Además, se observaron hojas atrofiadas en los tratamientos con mayor número de brotes y combinación de reguladores de crecimiento, similar a lo obtenido por (27), que al utilizar el medio de cultivo con 2 mg/L de BAP combinado con 1 mg/L AG3 dieron

lugar a nuevos explantes atrofiados con hojas estrechas e hiperhidricidad de naranja agria.

En la fase de enraizamiento el tratamiento E4 con medio MS al cual se le adicionó 1 mg/L de IBA y 1 mg/L de ANA fue el que presentó mejores resultados, obtenido 94,7 % de explantes con raíces. Estos resultados reafirman los logrados por (32), quienes comprobaron que ANA induce porcentajes más altos de enraizamiento que IBA en varias especies del género *Citrus*. Además, los resultados de nuestro trabajo son similares a los obtenidos por (27) en naranja agria, con casi 95% de explantes enraizados cuando combinaron en el medio de cultivo 1 mg/L de IBA con 1 o 2 mg/L de ANA.

Con lo demostrado se puede regenerar plantas de naranja agria a partir de segmentos nodales en condiciones *in vitro*, de esta manera al tener mayor número de brotes por explante permitirá del mismo modo obtener una mayor tasa de multiplicación. Además de que se logra porcentajes de enraizamiento mayor al 94%, lo cual asegura que las plantas puedan desarrollarse adecuadamente. Con las plantas producidas por este método se pretende recuperar y repoblar la campiña de Huacho al ser una especie de gran importancia en la gastronomía local. Finalmente, también se podrá emplear el germoplasma en condiciones *in vitro* para programas de mejoramiento genético vegetal.

Conclusiones

Se logró micropropagar *in vitro* naranja agria a partir de segmentos nodales. Los mejores resultados en la fase de desinfección en los explantes se obtuvieron al emplear 1,5% y 2% de hipoclorito de sodio. En la fase de la multiplicación *in vitro* los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo con 0,25 mg/L de BAP, 0,25 mg/L KIN y 0,25 mg/L de AG3, el cual se recomienda emplear por permitir obtener mayor número de brotes. Y finalmente en la fase de enraizamiento el medio suplementado con 1 mg/L de IBA y 1 mg/L de ANA permitió obtener el mayor porcentaje de explantes enraizados y número de raíces.

Referencias bibliográficas

- Schimmenti E, Borsellino V, Galati A. Growth of citrus production among the Euro-Mediterranean countries: political implications and empirical findings. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2013, 11(3): 561-577.
- Fatih H, Söyler O. Citrus production and evaluation of export in the World and Turkey. *The Journal of Academic Social Sciences* 2018, 79:357-366.
- FAO. 2017. Citrus Fruit - Fresh and Processed. Statistical Bulletin 2016. Rome. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>
- Márquez O, Cosío R, Márquez F, Robladillo L. Production and export of peruvian mandarin to the russian federation market, as a business opportunity, period 2013-2017. *Journal of Global Management Sciences* 2018, 1(1): 22-29.
- Acosta-Pérez J, Ortiz-García C, Zaldívar-Cruz J, Rodríguez-Cuevas M, Bautista-Muñoz M, Castillo-Aguilar C. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 2012, 28(3): 245-258.
- Díaz H, Honorio Z, Hernández A, Durand M, Gózalo A, Domínguez G. Identificación de especies frutícolas nativas con potencialidad productiva en peligro de extinción en la provincia de Huaura. *Aporte Santiaguino* 2020, 13(2): 78-91.
- Díaz-Pillasca HB, Hernández-Amasifuen AD, Machahua M, Pineda-Lázaro AJ, Argüelles-Curaca A, Lugo B. DNA barcoding of three species of fruit trees with economic potential from the Huaura Valley, Lima, Peru. *Revista Bionatura* 2021, 6(3): 1992-2000.
- Murcia R, Osorio A, Caicedo A, Calvert L, Morales F. Distribución y Caracterización Serológicas de Aislamiento del Virus de la Tristeza de los Cítricos en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 2002, 26(1): 21-26.
- Quiroga J, Hernandez F, Silva M, Orduz J. Comportamiento de la producción de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertada sobre el patrón de mandarina Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) y la influencia del virus de la tristeza (CTV) en condiciones del piedemonte del Meta, 1997-2008. *Orinoquia* 2010, 14(1): 5-15.
- Martínez-Hernández M, Alonso A, Osorio-Acosta F, Gallardo F, López H, Mata M. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia* 2006, 31(8): 616-619.
- Chaparro-Zambrano N, Velásquez H, Orduz-Rodríguez J. Influencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en el comportamiento de la lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre seis patrones en el piedemonte llanero de Colombia (1997 - 2008). *Ciencia & Tecnología Agropecuaria* 2013, 14(1): 33-38.
- Cervera F, Fagoaga M, Durán-Vila C, Peña N. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta Horticult.* 2004, 632(1): 221-234.
- Hasan M, Hasan M, Foyal S, Hoque H, Khan M, Bhuiyan M, Prodhan S. In-Vitro Regeneration of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from Mature Seed Derived Embryogenic Callus on Different Solid Basal Media. *American Journal of Plant Sciences* 2019, 10(2): 285-297.
- Pineda A, Hernández A, Díaz H. Multiplicación y reducción del crecimiento *in vitro* de papa chaucha (*Solanum tuberosum* L. grupo Phureja). *Manglar* 2021, 18(2): 42-47.
- González J, Zawadski K. Aplicación de la biotecnología en cítricos para el desarrollo de plantas libres de patógenos en Paraguay. *Revista de Ciencia y Tecnología* 2019, 31(1): 16-21.
- Khan M, Hoque H, Islam M, Ashrafuzzaman M, Prodhan S. An Efficient Regeneration System for Native Orange (*Citrus reticulata*) through In-Vitro Culture Technique. *Agricultural Sciences* 2019, 10(7): 975-984.
- Hernández A, Pineda A, Rojas J, Díaz H. Regeneración *in vitro* de arnauco (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de yemas apicales. *Manglar* 2021, 18(1): 71-75.
- Jardak R, Boubakri H, Zemni H, Gandoura S, Mejri S, Mliki A, Ghorbel A. Establishment of an *in vitro* regeneration system and genetic transformation of the Tunisian 'Maltese half-blood' (*Citrus sinensis*): an agro-economically important variety. *3 Biotech* 2020, 10: 99.
- Haradzi N, Khor P, Subramaniam S, Chew B. Regeneration and micropropagation of Meyer lemon (*Citrus x meyeri*) supported by polymorphism analysis via molecular markers. *Scientia Horticulturae* 2021, 286(10):11022.
- Kobayashi A, Besspalhok J, Pereira L, Vieira L. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2003, 74(1): 99-102.
- Hernández Y, Silva J, y Borges M. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. 'Mexicana' a partir de semillas. *Biotecnología Vegetal* 2013, 13(3): 181 - 187.
- Lihua L, Calderón A, Cabrera R. Influencia de sacarosa y cotiledones en la microinjertación de cítricos. *Revista Científica Ecuatoriana* 2019, 6(1): 24-35.
- Chávez J, Arboleda M. Propagación *in vitro* del limón criollo (*Citrus limon*) con el empleo de dos reguladores de crecimiento. Tesis de Pregrado. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador. 2011.
- Pérez-Tornero O, Tallón C, Porrás I. An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2009, 100(3): 263-271.
- Vidal M. Propagación *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle)-variedad Tahití-a partir de segmentos nodales. Tesis de Pregrado. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 2014.
- Sen S, Dhawan V. Development of a Highly Efficient Micropropagation Method for the Citrus Rootstock 'Swingle' Citrumelo [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *C. paradisi* McFaden]. *International Journal of Fruit Science* 2010, 10(1): 65-78.
- Tallón C, Porrás I, Pérez-Tornero O. Efficient propagation and rooting of citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 2012, 48(5): 488-499.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 1962, 15(3): 473-497.
- Azofeifa A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 2009, 20(1): 153-175.
- Carimi F, De Pasquale F. Micropropagation of Citrus. In: Jain SM, Ishii K (eds) *micropropagation of woody trees and fruits*. *Forestry Sciences* 2003, vol 75. Springer, Dordrecht pp 589-619.
- Kotsias D, Roussos P. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. *Scientia Horticulturae* 2001, 89(2):115-128.
- Rathore J, Rathore M, Singh M, Singh R, Shekhawat N. Micropropagation of mature tree of Citrus limon. *Indian Journal of Biotechnology* 2007, 6(2): 239-244.

Received: 11 junio 2021

Accepted: 29 septiembre 2021