

Revisión bibliográfica APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS EN FRUTALES, UNA VÍA VALIOSA PARA EL RESCATE Y LA CONSERVACIÓN DE ESTAS ESPECIES

Argelys Kessel[✉]

ABSTRACT. Fruits constitute the most important foods among natural vegetables. They along with garden crops provide a lot of vitamins and minerals; thus, they should be present in every meal. Fruits are used as CO₂ reservoir, in biodiversity increment and ecological compensation areas; besides, they are appreciated for fresh consumption, juices and pulps. In Cuba, there are favorable edaphoclimatic conditions for fruit tree growth and development; however, a large number of them appear at the top of the list of threatened species in our country, so that urgent measurements of preservation and management should be taken into account. Biotechnology may help increase and improve fruit tree production; this technology enables to obtain a high-yielding material. Also, tissue culture has given a great support to agriculture and constitutes a fundamental approach in the scientific-technological activity; consequently, the application of *in vitro* propagation techniques to fruit trees is a valuable way to multiply, rescue and preserve these species.

RESUMEN. Los frutales constituyen los alimentos más importantes dentro de los vegetales naturales. Las frutas junto con las hortalizas proporcionan muchas vitaminas y minerales; por ello son alimentos que deben estar presentes en todas las comidas. Tienen uso variado como reservorio de CO₂, en el incremento de la biodiversidad y en las áreas de compensación ecológica; además, son preciados como fruta fresca, jugos y pulpas. En Cuba se encuentran favorables condiciones edafoclimáticas para el crecimiento y desarrollo de los frutales; sin embargo, hay un gran número que encabezan la lista de especies amenazadas en nuestro país, por lo que hay que tomar medidas urgentes de conservación y manejo. La biotecnología puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de frutales; esta tecnología permite obtener material de elevada productividad. Además, el cultivo de tejidos ha dado un gran aporte a la agricultura y constituye una vía fundamental en la actividad científico-tecnológica, por lo que el empleo de las técnicas de propagación *in vitro* en frutales resulta una vía valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de estas especies.

Key words: tissue culture, plant propagation, culture techniques, plant biotechnology, fruit crops

Palabras clave: cultivo de tejidos, propagación de plantas, técnicas de cultivo, biotecnología vegetal, frutales

INTRODUCCIÓN

Los frutales constituyen los alimentos más importantes dentro de los vegetales naturales. Las frutas junto con las hortalizas proporcionan muchas vitaminas y minerales, por lo que son alimentos que deben estar presentes en las comidas. Comiendo frutas y verduras, el organismo humano no tendrá carencia de vitaminas o minerales, si se incluyen las proteínas animales.

Las vitaminas hidrosolubles (B y C) no se almacenan en el organismo; es por ello que se debe comer alimentos que las contengan. La vitamina C, por ejemplo, además de ser un potente antioxidante, contribuye a una buena salud de los huesos, ayuda a sanar las heridas, además de reforzar la acción de la vitamina E, otro potente antioxidante (1).

Las frutas además de proporcionar vitaminas y minerales, desempeñan ciertas funciones de suma importancia, como la de alcalinizar la sangre para contrarrestar la acidez excesiva que producen alimentos como los huevos, los cereales y las carnes, debido a su contenido en sales de potasio y magnesio, que favorecen la eliminación de líquidos

y el exceso de residuos nitrogenados y cloruros, por lo que purifican el organismo (1, 2, 3).

Los frutales tienen uso variado como reservorio de CO₂, en el incremento de la biodiversidad, en las áreas de compensación ecológica, son preciados como fruta fresca, jugos y pulpas orgánicas y, al mismo tiempo, contribuyen a mejorar la fertilidad de los suelos por el reciclaje de nutrientes producido en los agroecosistemas de producción orgánica (4).

Las tendencias mundiales abren un espacio cada vez mayor al uso de la biotecnología, ya que la humanidad enfrenta el reto de cómo satisfacer las necesidades de una población creciente (5), donde la biotecnología

Argelys Kessel, Reserva Científica del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ argelys@inca.edu.cu

puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de alimentos (6), pues esta tecnología permite obtener material de elevada productividad (7).

El desarrollo alcanzado en el cultivo de tejidos, desde sus inicios hasta la fecha, representa un gran aporte a la agricultura y, en la actualidad, constituye una vía fundamental en la actividad científico-tecnológica (8).

Varias técnicas de propagación *in vitro* se han empleado para mejorar un gran número de especies frutales, de interés económico para Cuba. Algunos de los trabajos que se realizan con el empleo de estas técnicas *in vitro*, están basados en la callogénesis, embriogénesis somática, micropropagación y evaluación del efecto de las fitohormonas comerciales y diferentes biorreguladores cubanos en los medios de cultivo (9, 10).

El uso de técnicas biotecnológicas ofrece la posibilidad de multiplicar masivamente genotipos valiosos incluyendo los frutales que se encuentran amenazados, como el marañón (*Anacardium occidentale* L), por lo que puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de especies de importancia económica.

A partir de los resultados de los últimos años, en una gran cantidad de especies vegetales se ha extendido el empleo de las técnicas biotecnológicas, por lo que resulta valiosa la aplicación de estas en las especies frutales. De aquí que el objetivo del presente trabajo consiste en resaltar la importancia de esas técnicas biotecnológicas en la multiplicación, el rescate y la conservación de los frutales, justificando así su inclusión en los programas agrícolas.

IMPORTANCIA DE LOS FRUTALES

En cuanto a las frutas se refiere, la naturaleza ha sido verdaderamente pródiga en colores, formas, aromas y sabores, pero la intervención del hombre también ha sido fundamental, pues gracias a su curiosidad innata, traducida en viajes de investigación, y a las colonizaciones,

muchas especies fueron llevadas desde sus lugares de origen a otras partes del mundo donde proliferaron. También ha sido primordial la participación del hombre en la conservación de antiguas especies, en la adaptación de algunas a nuevas tierras y condiciones climáticas, en la mejora de su calidad y multiplicación de sus variedades. Debe tenerse en cuenta que si bien el origen de las frutas en general data de miles de años, en la actualidad hay muchísimas más especies (3).

Los diferentes nutrientes que en cantidad y calidad diversas contienen las frutas, en general constituyen un aporte de suma importancia para el adecuado funcionamiento del organismo humano (1, 3).

Los principales componentes que contienen las frutas son los siguientes:

- ★ minerales
- ★ vitaminas
- ★ flavonoides
- ★ fibra
- ★ saponinas
- ★ fenoles
- ★ carotenoides
- ★ isocianatos

Todos estos no solamente ayudan a que el cuerpo esté nutrido, sino que previenen la aparición de muchas enfermedades, tal como se ha venido demostrando en los estudios realizados en los últimos años (1).

La fibra que proporcionan las frutas es aquella parte de los vegetales que el aparato digestivo no puede digerir, pero resulta muy importante para la expulsión de la materia fecal. La ingestión de abundante fibra no solamente supone una manera útil de prevenir el estreñimiento, ya que estudios recientes han demostrado que una rica dieta en fibra reduce el colesterol, ayuda a los diabéticos a controlar el azúcar de la sangre y previene la aparición del cáncer de colon. Los frutos ricos en fibra son las fresas, los cítricos, entre otros (1, 2).

Cítricos. Se cultivan y consumen hoy en grandes cantidades en muchas partes del mundo. Dentro del orden de su importancia y popularidad, se encuentra, en primer lugar, la naran-

ja dulce, seguida de los limones, las mandarinas y los pomelos. También cabe citar la lima, cítrico muy popular en América, cuyo consumo va ganando preferencias en Europa (3).

La importancia nutritiva de los cítricos es su alto contenido en vitamina C, así como en azúcar, sacarosa, glucosa y fructosa principalmente y, en menor grado, de ácidos y sales minerales. Aunque las dosis de azúcares y ácidos que contienen los cítricos varían según la especie de que se trate y las condiciones del cultivo y el clima en que se haya desarrollado la planta, todos tienen un rico contenido en vitamina C.

La forma más fácil y sana de consumir los cítricos es en zumo. Entre ellos, el de naranja continúa siendo el más popular de los zumos cítricos, seguido del de pomelo, pero no debe descartarse el de mandarina, un poco menos rico en vitamina C, pero muy sabroso y aromático. La cantidad de vitamina C que necesita el organismo diariamente se obtiene bebiendo un poco más de medio vaso de zumo de naranja (3).

Rosáceas. Entran dentro de esta gran clasificación las manzanas, peras, melocotones, albaricoques, ciruelas, cerezas y fresas, pero también se incluyen en ellas otras menos populares, como los nísperos. Estas frutas tienen distintas propiedades, en general muy beneficiosas para el organismo, por lo cual es recomendable el consumo de la mayor variedad posible. Así como la manzana, fruta bíblica, es rica en ácidos que favorecen la digestión y en pectina, un germicida natural, la pera lo es en oligoelementos y enzimas. Los melocotones son una importante fuente de carotenos, vitaminas C y del grupo B e importantes minerales (calcio, magnesio y potasio), mientras que los albaricoques son riquísimos en vitaminas, minerales y azúcares, y en las ciruelas abundan la fibra vegetal y pectina. Las cerezas y fresas, con un valor equilibrado de vitaminas y minerales, constituyen un excelente desintoxicante del organismo. **Anonáceas.** Las apreciadas propiedades alimenticias y el excelente sabor comercial, para la elaboración de

jugos, helados, néctares, mermeladas, dulces y pulpa congelada, que presentan las frutas de esta familia, son las que denotan el creciente interés por parte de los consumidores, en los mercados frutícolas e industrias de América del Sur, América Central y del Caribe (11). Las anonáceas tienen alto valor calórico por la presencia de carbohidratos, aportan minerales como el calcio, fósforo y hierro, y son ricas en vitamina C y provitamina A. Se encuentran dentro de este grupo las chirimoyas, guanábanas, el anón y caimito.

Otras frutas

● Plátano (*Musa sp*)

Suele excluirse de las dietas para adelgazar y sacia el estómago e induce a comer menos, por lo que no se trata de prohibir sino de disminuir las calorías que aportan los demás alimentos. Los plátanos constituyen una fruta energética por excelencia, son fuentes de vitamina C, caroteno, riboflavina, ciertas vitaminas del grupo B y especialmente son ricos en minerales, sobre todo en fósforo y hierro.

● Piña (*Ananas comosus* L)

Aporta vitaminas A, B y C, yodo, magnesio, calcio, fósforo, hierro y azufre (3). Además contiene bromelina, una enzima que favorece la digestión (1).

● Guayaba (*Psidium guajava* L)

Es una fruta muy popular tanto para consumo fresco como para el procesamiento y la obtención de diversos productos como: jugo, néctar, concentrados, jalea, bocadillo y relleno para dulces. Esta gran aceptación se debe a su valor comercial, digestibilidad, palatabilidad, sabor agradable y valor nutritivo; excelente fuente de las vitaminas A, C, tiamina, riboflavina y ácido nicotínico; así como de los minerales calcio, hierro y fósforo, además de carbohidratos. Los frutos de esta especie, en general, se caracterizan por el bajo contenido de carbohidratos (13,2%), grasas (0,53%) y proteínas (0,88%), y por el alto contenido de humedad (12).

● Marañón (*Anacardium occidentale* L)

Los frutos son agradables, jugosos, con gran contenido de ácido cítrico y taninos. Es apreciado por sus múltiples usos: el pseudofruto o pedúnculo ensanchado y maduro se consume como fruta fresca, la cual es muy nutritiva y con altos contenidos de peptinas y vitamina C (250 mg.100 mL⁻¹ de jugo); su jugo es digestivo, bactericida y antidisentérico. Igualmente, fermentado, se emplea en la preparación de vinos, vinagres y licores. La almendra tiene uso industrial en la fabricación de cosméticos, resinas, barnices, tintes, así como productos para confiterías y pastelerías, entre otros (13).

APLICACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS EN FRUTALES

Embriogénesis somática. Es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (14). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apoximis llamada embriónía adventicia, que por primera vez fue descrita por Strasburger (15). Los primeros en tener evidencias de este proceso fueron Reinert (16) y Steward (17).

Este proceso ha sido muy utilizado en los últimos años en la propagación *in vitro*, por sus múltiples aplicaciones, su alto rendimiento en la producción de callos embriogénicos y embriones somáticos (18).

Por lo que la regeneración de plantas *in vitro* vía embriogénesis somática se ha convertido en un prerequisite indispensable, para la aplicación de algunas herramientas de la biotecnología en la mejora genética de las plantas (19).

El creciente interés por la obtención de embriones somáticos en diversos cultivos, se debe a que el proceso de embriogénesis somática facilita la propagación clonal a gran escala y el empleo de la semilla artificial (20).

En este sentido, cabe destacar los efectos beneficiosos que posibilita el uso de esta técnica, como un

método de propagación de plantas que puede facilitar la automatización del proceso y permitiría la siembra directa de los cultivos, a diferencia de la propagación vegetativa convencional; es por ello que se ha señalado que la formación de embriones somáticos a partir de tejidos adultos de plantas (hojas), ha hecho de la embriogénesis somática un sistema modelo para muchos cultivos y un elemento de interés económico (9).

En los medios de cultivo se utilizan fitohormonas comerciales como las auxinas, giberelinas y citoquininas, aunque en los últimos años se han incorporado algunos biorreguladores como los brasinoesteroides y oligosacarinas, todos ellos con la finalidad de ser incorporados para el cultivo de óvulos, embriones, callos, así como plántulas, con el fin de acelerar el desarrollo de estos. Además, se conoce que estas sustancias tienen carácter estimulante, acelerando el desarrollo vegetativo e intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas (21, 22).

La embriogénesis somática se usa generalmente en el cultivo de los cítricos, con el objetivo de viabilizar el proceso de mejoramiento genético, en el desarrollo de diferentes cultivares, sin que afecte la presencia de incompatibilidad genética y/o reproductiva (23).

Debido a la importancia que los investigadores le atribuyen a los biorreguladores sintéticos cubanos, en el cultivo de tejidos se realizó una investigación, donde se emplearon el Biobras-6, MH-5 (análogos de brasinoesteroides), brasinoesteroide natural (24-Epibrasinólido) y Pectimorf (oligogalacturónido), en el proceso de embriogénesis somática en el cultivo de mandarina (*Citrus reshni Hort. ex Tan*), para facilitar la obtención acelerada y estable genéticamente de las diferentes estructuras vegetales de la especie (24).

Se realizó un estudio citogenético con las raíces de las plántulas provenientes de embriones somáticos, en un medio constituido por las sales de Murashige y Skoog (25), 1 mg.L⁻¹ de vitaminas de White (clorhidrato de

piridoxina), 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,2 mg.L⁻¹ de clorhidrato de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 50 g.L⁻¹ de sacarosa, 500 mg.L⁻¹ de extracto de malta y suplementado o no con el Biobras-6, MH-5 (análogos de brasinoesteroides), brasinoesteroide natural (24- Epibrasinólido) y Pectimorf (oligogalacturónido), demostrándose que el empleo de estos, en el proceso de embriogénesis somática, no provocó variaciones en el número de cromosomas (24).

Por otro lado, en el cultivo de la guayaba la embriogénesis somática constituye una eficiente herramienta para su propagación y mejoramiento genético (26, 27). Por lo que resultó interesante probar diferentes concentraciones del regulador del crecimiento ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), para establecer la técnica de embriogénesis somática en este frutal a partir del cultivo de embriones cigóticos (28).

En este caso, con el objetivo de determinar el efecto de diferentes concentraciones del regulador de crecimiento antes mencionado, se evaluó el porcentaje de formación de callos con estructuras embriogénicas, el número de embriones somáticos por explante y porcentaje de embriones en etapa globular, corazón y torpedo, además, los cotiledones que formaron embriones somáticos. Transcurridas dos semanas, se pudo apreciar la presencia de un callo compacto, seco y de color marrón brillante, con estructuras embriogénicas y la aplicación de 1 mg.L⁻¹ de 2,4D. Con todas las concentraciones de 2,4D empleadas se obtuvieron embriones somáticos; sin embargo, la concentración más baja proporcionó mayor porcentaje de formación de callos (28).

En muchos sistemas experimentales, desarrollados para especies frutales recalcitrantes, el establecimiento de un eficiente protocolo se basa en el uso de material juvenil como fuente de explante (26, 27). Se ha señalado que el bajo número de plantas en campo por cultivo embriogénico y la poca habilidad del tejido maduro para iniciar cultivos

embriogénicos, son las mayores limitaciones de la embriogénesis somática en especies leñosas (29).

En estas especies, para lograr el éxito de la embriogénesis somática, el explante debe ser obtenido de plantas altamente vigorosas. Además, se señala que los órganos o tejidos inmaduros son más morfogénicamente manejables *in vitro* que los órganos o tejidos maduros (30).

Al respecto, diferentes investigadores han trabajado con cotiledones en etapa pequeña y precoz de especies recalcitrantes como marañón, para determinar los factores que influyen en el proceso de embriogénesis u organogénesis en este importante frutal (31).

Para ello, los cotiledones se seccionaron en tres porciones: próxima, mediana y distal al eje embrionario. Las secciones fueron cultivadas en posición adaxial y abaxial durante cuatro, seis u ocho días en contacto con el medio Murashige y Skoog, conteniendo la mitad de las sales minerales y suplementado con 0.045, 2.3 y 4.5 M del regulador del crecimiento (2.4-D). Posteriormente, se transfirieron para el medio MS sin regulador del crecimiento y a los 21 días se evaluó el número de callos y raíces formadas; además, se evaluó el tamaño de los cotiledones. Se determinó que las posiciones cotiledonales no influyeron en el número de callos ni en el número de raíces formadas (31).

Organogénesis. Resulta valioso resaltar la gran utilidad que varios investigadores le atribuyen a la técnica de organogénesis *in vitro* en diferentes frutales, debido a su importancia en la multiplicación de plantas.

La organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, es decir, la formación de un primordio unipolar a partir de una yema, con el subsecuente desarrollo de un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía for-

mación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. En la organogénesis directa, los brotes se forman directamente del explante y en la organogénesis indirecta lo hacen a partir de la formación de callos (32).

Al respecto, se ha dicho que cuando los individuos han alcanzado su estado adulto es casi imposible clonarlos y que en la mayoría de las especies dicha condición de adultez restringe las capacidades morfogénicas del individuo (30, 33). Por lo que será más fácil lograr organogénesis en cultivos *in vitro*, cuando esta se inicia a partir de explantes separados de ejemplares juveniles o distintas partes del embrión. La regeneración *in vitro* de plantas mediante organogénesis directa (es decir, sin la formación previa de callo) es altamente importante en los trabajos de micropropagación y conservación de germoplasma en frutales (34).

La regeneración de maracuyá (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) mediante el cultivo de tejidos ha sido realizada con éxito. En este sentido se desarrolló una metodología sencilla para producir plantas de maracuyá a partir de la organogénesis directa de explantes foliares (35). Se utilizaron explantes provenientes de hojas jóvenes y fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (4 % V/V) durante 20 minutos en cámara de flujo laminar. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Para llevar a cabo el experimento se trabajó con diferentes concentraciones de Bencil Amino Purina (BAP) 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg.L⁻¹ en medio MS, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y solidificado con agar. A los 15, 25 y 35 días se evaluó el porcentaje de formación de callos y se obtuvo el mayor porcentaje en los tratamientos donde se empleó 0.6 mg.L⁻¹ de BAP. Sin embargo, cuando se trabajó con la mayor dosis de BAP se apreció, en algunos casos, organogénesis directa, aspecto muy importante, porque al no desarrollarse los brotes a partir de callos, dis-

minuye la posibilidad de variación somaclonal (35).

La organogénesis directa ha sido aplicada también en otros frutales como la naranja dulce (*Citrus sinensis*), con el propósito de obtener múltiples vástagos a partir de hojas cotiledonares provenientes de embriones somáticos (34). Para ello se aislaron las nucelas y se cultivaron en el medio basal MS, más la adición de 1 mg.L⁻¹ de cinetina (cin). Se obtuvieron embriones somáticos en forma directa a partir de los 30 días. Para la regeneración de los vástagos, se probaron diferentes combinaciones y concentraciones de citocininas en el medio MS, además se consideraron tres posiciones diferentes respecto al eje embrionario y tres zonas de corte, con el objetivo de evaluar la respuesta organogénica de las distintas porciones de hojas cotiledonares.

Los mejores resultados de regeneración de vástagos se obtuvieron en los medios constituidos por la concentración de 1 mg.L⁻¹ de BAP, 6 mg.L⁻¹ de Sulfato de Adenina (SA), 0.01-0.1 mg.L⁻¹ de cin y en las porciones de hoja media y proximal a partir de la zona de corte (34).

Teniendo en cuenta los resultados en el cultivo del marañón en la embriogénesis somática, se realizaron diferentes estudios con el propósito de evaluar otras técnicas de propagación, dentro de ellas la organogénesis *in vitro*. Se utilizaron como explante: microestacas, hojas jóvenes y cotiledones de la semilla madura. Se empleó el medio MS con las sales nitrogenadas reducidas a la mitad y se comparó con el medio Sheik- Hildebrandt (SH) (36). Se estudió el efecto de las fitohormonas zeatina, 6-BAP, kinetina, 2iP, GA₃, TIBA, ácido naftalenacético (ANA) individualmente y en combinación. La presencia de GA₃ en combinación con la zeatina mejoró la formación de nudos. La morfogénesis se logró a partir de callos con estructuras globulares en el caso de hojas y a partir de las estructuras nodulares en los cotiledones en el medio SH con una concentración alta de ANA y 6-BAP

en combinación. Los callos se lograron a partir de explantes de hojas y peciolo cuando se utilizaron diferentes concentraciones de ANA/BAP ó 2,4D/ BAP combinadas en medio MS. Se indujeron raíces adventicias y secundarias solo en presencia de ANA. La inducción del embrión a partir de células somáticas se observó 12 meses después del subcultivo en la posición adaxial de los cotiledones y en el medio SH suplementado con ANA/BAP (3/0.8 mg.L⁻¹) (37).

Cultivo de embriones cigóticos. El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos ha sido efectivo, en el rescate de embriones abortivos derivados a partir de la hibridación interespecífica o intergenérica y en el rescate de material de propagación de frutales con semillas de baja viabilidad, así como también para acortar la latencia de semillas, que en algunos casos es debida a inhibidores del desarrollo del embrión, presentes en el endospermo o en la cubierta de la semilla. El cultivo de embriones ha ayudado al mejoramiento genético de especies arbóreas, porque permite acortar el período de siembra a floración (38).

En un sentido estricto, el material no se está multiplicando clonalmente, aunque sí se está multiplicando el germoplasma que de otra manera se perdería; de aquí que se justifique incluir este sistema en la lista de estrategias para la multiplicación de materiales valiosos (39).

Otros indicaron que los sistemas de micropropagación son una herramienta importante para el mejoramiento y la propagación clonal masiva de genotipos seleccionados y que el uso de embriones puede justificarse cuando los métodos de propagación convencionales presentan una baja eficiencia en la especie (40).

Se han realizado trabajos a partir de embriones cigóticos maduros de marañón, estableciéndose un procedimiento que permite la liberación y el aislamiento de los embriones, evadiéndose la dureza y resistencia del epicarpio, y la presencia de microorganismos superficiales. Para esto se llevó a cabo un eficiente proceso de desinfección-imbibición.

Este se realizó de manera simple y doble. Se seleccionó la desinfección simple con 48 horas de imbibición, para garantizar reducir la contaminación microbiana al 2 %, lograr más del 70 % de embriones viables y un 100 % de germinación *in vitro* de los embriones. Se determinaron tres etapas de crecimiento y desarrollo de los embriones hasta convertirse en plantas: germinación, alargamiento del hipocotilo y plántula. Se detectaron factores de carácter mecánico e intrínseco al material vegetal, que redujeron el porcentaje de embriones viables (41).

En la especie *Psidium guajava* (guayaba) se trabajó con embriones cigóticos inmaduros para evaluar el efecto de varias citocininas. Se extrajeron los explantes de frutos inmaduros, presentando embriones sin el endospermo desarrollado. Se le realizó previamente un proceso de desinfección a los frutos y posteriormente se aisló el embrión y se sembró en tubos de ensayo de 150 mm x 25 mm con 10 mL de medio nutritivo MS suplementado con 1 mg.L⁻¹ de las vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar. A partir de los explantes obtenidos, se indujo la formación de callos empleando diferentes tipos de citocininas. Las citocininas empleadas fueron: ribozeatina, zeatina, cinetina, benciladenina y 2-isopenteniladina, con diferentes niveles de concentración. Con el empleo de ribozeatina y zeatina, se indujo la alta formación de callos en los tratamientos (42).

Cultivo de meristemos. El cultivo de meristemos o de ápices de tallos es un microestaquillo que necesita de puesta a punto de medios apropiados a cada caso particular (43). Algunos plantean que entre los elementos más importantes a considerar en esta técnica, se encuentran los reguladores de crecimiento y elementos minerales (44).

Teniendo en cuenta este planteamiento, otros investigadores realizaron una investigación, con el objetivo de evaluar el efecto de fitohormonas exógenas en la

reactivación y el posterior desarrollo de ápices de cafeto (*Coffea arabica*) (45). Para la inoculación se utilizaron ápices de 2 a 3 mm de longitud acompañados de uno o dos primordios foliares, aislados de vitroplántulas, de seis meses de edad. La excisión de los ápices se realizó en la cámara de flujo laminar.

En este caso se estudió el efecto de citoquininas y se utilizó el medio basal MS (libre de citoquininas) como testigo, se ensayaron cuatro dosis de BAP y Kinetina, y se demostró que la emisión de brotes requiere de altas concentraciones de citoquininas. Además, se estudiaron cuatro dosis de ácido abscísico (ABA) y en presencia de 8 mg.L⁻¹ se obtuvo el mayor número de brotes secundarios por ápice inicial y el coeficiente de multiplicación más elevado. También se emplearon cuatro niveles de triptófano, para estudiar su efecto en un medio libre de auxinas y resultó favorable en el desarrollo de los ápices. Sin embargo, cuando se ensayaron las dos concentraciones de ácido indolacético (AIA), asociadas a cuatro dosis de BAP, se comprobó que no ejerció efecto positivo en la tasa de multiplicación de ápices (45).

Aplicación del cultivo de anteras. El cultivo de anteras es el principal método para la producción de haploides (46). El interés en las plantas haploides parte de su considerable potencial para cruzamiento y el poder ser utilizados para facilitar la detección de mutaciones y recuperación de recombinantes raros (47, 48).

Esta valiosa técnica ha sido empleada en el cultivo de la piña, en trabajos de mejoramiento genético de esta especie (49). Para ello, las inflorescencias se colectaron en estado inmaduro y se sumergieron durante cinco segundos en etanol (70%) y 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (1 %); posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Luego se sembraron en placas petri alrededor de 50 anteras en medio MS suplementado con 3 y 9 % de sacarosa y seis combinaciones diferentes de Dicamba/BAP para

cada concentración de sacarosa. Cuando se evaluó el efecto de dos concentraciones de sacarosa en la formación de callos en las anteras de piña, se observó la formación progresiva de callos blanquecinos o blanco amarillentos. Con la concentración de 3 % de sacarosa se obtuvieron microcallos, mientras que con un 9 % se observaron callos de tipo compacto, globulares y de mayor tamaño. En los medios con bajas concentraciones hormonales no se logró formación de callo y los mayores porcentajes se detectaron con la combinación Dicamba/BAP de 2,0: 0,4 mg.L⁻¹ y 2,55: 0,5 mg.L⁻¹ (49).

Con el empleo de las técnicas biotecnológicas, el programa de mejoramiento genético puede ser reducido en varios años con la obtención de individuos homocigóticos a través del cultivo de anteras. Con este objetivo se han realizado estudios, para definir medios de cultivo eficientes en el cultivo de anteras en la especie *Anacardium occidentale* (50). Para ello se utilizaron botones florales de marañón para extraer las anteras; estas fueron inoculadas en medio MS sólido. Se utilizaron seis medios de cultivo con tres repeticiones y cinco anteras por placa petri durante 30 días de cultivo. Se obtuvo diferencias en los tamaños de las anteras en todos los tratamientos y se pudo observar, además, mayor crecimiento en las anteras que fueron mantenidas sin moverse y en la oscuridad, y estas presentaron también mayor número de callos.

Multiplicación in vitro mediante sistema de inmersión temporal. El empleo de medios líquidos en protocolos de propagación masiva se ha convertido en una necesidad, para abaratar los costos de producción de plantas obtenidas *in vitro*, pero es solo hasta los sistemas de inmersión temporal (SIT) cuando se vislumbra su potencial aplicación (51).

Los SIT además de solucionar las dificultades de los cultivos estáticos, despliegan la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro*, permiten mayor facilidad de escalado y aumentan los índices

de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado (51). Los SIT pueden aplicarse en la propagación masiva de plantas élites, mediante la organogénesis o embriogénesis somática, para incrementar el coeficiente de multiplicación en comparación con las formas convencionales de propagación *in vitro* (cultivo en medio sólido o líquido semi-sumergido o sumergido) (52).

Considerando las ventajas del empleo de los SIT, diferentes investigadores han aplicado esta metodología en la multiplicación *in vitro* de los frutales. En ensayos realizados donde se utilizó como material vegetal el banano Musa (AAA) cv. Williams subgrupo Cavendish, en la fase de iniciación se redujo el tamaño de los ápices hasta aproximadamente 3 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, y se colocaron en medio de iniciación (MI) líquido modificado sin hormonas, sustituyéndolas por agua de coco al 15 % (53). Transcurridos siete días, se eliminaron los explantes contaminados y los que sobrevivieron pasaron directamente a la fase de multiplicación en medios sólidos y líquidos.

El medio para la iniciación MI, e inducción de brotes axilares MIB en microcornos de *Musa spp.* fue el de Murashige y Skoog suplementado con 60 mg.L⁻¹ de cisteína, 100 mg.L⁻¹ ácido ascórbico, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 1 mg.L⁻¹ de ácido pantoténico, 0.01 biotina, 1 mg.L⁻¹ de tiamina y ph 5,8. Además, se le añadió al MI 15 % de agua de coco y 40 g.L⁻¹ de sacarosa, mientras que al MIB se le agregó 5 mg.L⁻¹ de BA, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 3 g.L⁻¹ de agente solidificante. En dicha investigación se comprobó que el sistema de inmersión temporal RITA aumenta los índices de multiplicación entre 3.5 y 2.6 veces más que el sistema de cultivo convencional en medio sólido (53).

Conservación en medio de mínimo crecimiento. Otra aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos es la conservación en medio de mínimo crecimiento. Este método es uno de los más utilizados y constituye una alternativa de las técnicas del cultivo de tejidos, para mantener las

plántulas en mejores condiciones sanitarias. Mediante esta técnica se logra un estricto control de plagas y enfermedades, al encontrarse el material confinado en un microambiente aséptico; también el sistema ocupa muy poco espacio y al propagarse clonalmente permite el mantenimiento del genotipo (54).

Teniendo en cuenta la utilidad y eficiencia de este método, ha sido empleado para la conservación *in vitro* de germoplasma de diversos frutales, tales como el marañón (55). En este caso, a partir de embriones cigóticos se realizó la conservación en medio de mínimo crecimiento, lográndose la represión del crecimiento y desarrollo; al combinar medios de baja, media y alta salinidad con varias concentraciones de manitol, las plantas pudieron mantenerse en estas condiciones durante seis meses sin subcultivos intermedios y solamente se recuperaron del estrés osmótico y de conservación, las procedentes del medio que contenían 0, 1 y 3 % de manitol, y las del MS con 0 y 1 % de este regulador osmótico. Posteriormente, las vitroplantas fueron sometidas al proceso de aclimatación, donde se obtuvo un 87 % de supervivencia. Además de las variables morfológicas, las observaciones estomáticas fueron un indicador efectivo, para conocer que las plantas fueron eficientemente aclimatizadas.

Otros investigadores han empleado este método, con el objetivo de conservar diferentes variedades de café en condiciones asépticas. Para ello se examinaron los efectos de las concentraciones reducidas de sacarosa y las bajas temperaturas (56). Se compararon concentraciones de 0.5 y 20 g.L⁻¹, y temperaturas de 20 y 27°. Después de seis meses, las concentraciones bajas de sacarosa redujeron el crecimiento de las microestacas, el enraizamiento y porcentaje de supervivencia. A temperaturas de 20°C, el crecimiento de las microestacas también fue reducido, pero hubo un aumento en la caída de las hojas y disminuyó el porcentaje de supervivencia. Se comprobó que estas variedades pueden ser conservadas durante seis meses

en un medio que contenga 20 g.L⁻¹ de sacarosa a 20°C de temperatura. **Aplicación de los marcadores moleculares.** Tradicionalmente, los métodos para identificar genotipos de plantas, así como para estimar las relaciones filogenéticas existentes entre ellas, se han basado en el estudio de características morfológicas (24). Sin embargo, estas características pueden ser alteradas por enfermedades, variar en función de la etapa del crecimiento o el ambiente agroclimático. En numerosas ocasiones existen genotipos mal indexados, especialmente cuando se trata de cultivares que presentan fenotipos muy similares. Por otra parte, la identidad genética de un cultivar puede modificarse, debido a mutaciones somáticas mantenidas durante su reproducción vegetativa (24).

Gracias a los avances en la biología molecular, se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales.

Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libre de los efectos epistáticos (57).

Los marcadores polimórficos del ácido desoxirribonucleico (ADN) o marcadores moleculares, son herramientas valiosas para los estudios genéticos de las plantas (58).

Muchos han aplicado los marcadores moleculares en diversas especies frutales del trópico y han obtenido relevantes resultados. Así, por ejemplo para determinar la aplicación del análisis de conglomerados, con el objetivo de complementar el estudio de patrones electroforéticos en la especie *Psidium spp.*, se utilizó la técnica de isoenzimas, el análisis de conglome-

merado complementó el estudio de zimograma y permitió diferenciar entre especies de *P. guajava* y *P. friedrichsthalianum* (59).

En el valioso frutal del marañón, otros aplicaron los marcadores: Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) y Polimorfismo en la Amplitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), para comparar las diferentes accesiones del banco de germoplasma y estudiaron la eficiencia y utilidad de las tres técnicas en la detección de variaciones entre plantas. Las técnicas pudieron discernir entre los distintos materiales. Pero los AFLP exhibieron el mayor poder de discriminación, de aquí que se recomienda para realizar los análisis genéticos (60).

El marcador RAPD también ha sido empleado en la especie *Pasiflora spp.*, para evaluar la variabilidad genética y estimar las tasas de similitud entre las diferentes especies, detectándose dentro de *P. edulis* una alta variabilidad genética (61).

Además, para la identificación de genotipos de mango (*Mangifera indica* L.) se ha empleado el marcador Microsatélite o Secuencias Simples Repetidas (SSR), porque resulta de gran utilidad en estudios de identificación, variabilidad y manejo de germoplasma y domesticación (57).

En otros estudios con el uso de la técnica RAPD, se determinó la variabilidad genética entre materiales de guanábana (*Annona muricata* L.) y se identificaron 14 fragmentos RAPD polimórficos. Con su empleo se determinó una alta variabilidad genética y, además, se identificaron dos grupos de materiales: los de origen venezolano y los de Brasil (62).

FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO Y DESARROLLO *In Vitro* DE LOS FRUTALES

El cultivo de tejidos, desde sus inicios hasta la fecha, ha dado un gran aporte a la agricultura y constituye una vía fundamental en la activi-

dad científico-tecnológica (8). Sin embargo, el cultivo de tejidos como vía para la multiplicación *in vitro* de los frutales, se ve limitado por la oxidación fenólica de sus tejidos y órganos, y por la contaminación microbiana.

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención microbiana, la cual ocasiona pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos y de investigación (63). Existen varias estrategias para controlar y manejar la contaminación que incluyen: a) la prevención mediante la selección y el tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial del explante e identificación de los microorganismos contaminantes, b) el control de la contaminación a través del uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemos (64).

No obstante, se han realizado numerosas investigaciones, con el objetivo de contrarrestar el efecto de los factores que afectan el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los frutales. En el género *Annona*, a fin de obtener grandes cantidades de plantas sanas en el menor tiempo posible, se evaluó el efecto del hipoclorito de sodio ante la contaminación, viabilidad y el oscurecimiento de explantes de guanábana (11). Para ello se emplearon dosis de 0, 0.5, 1 y 2 % de hipoclorito de sodio y se combinaron con dos tiempos de exposición: cinco y 10 minutos.

Los explantes se sembraron en un medio nutritivo MS reducido a la mitad de la concentración de las sales, complementado con 0.5 mg.L⁻¹ de Bencilaminopurina, 20 g.L⁻¹ de sacarosa y solidificado con agar. Se apreció que la desinfección superficial con el desinfectante utilizado no permitió el establecimiento aséptico de ápices y segmentos nodales. La dosis de 1 % de hipoclorito de sodio por 5 ó 10 minutos permitió un menor daño del explante y por ende una mayor viabilidad.

Otros han trabajado con embriones cigóticos maduros de marañón, teniendo en cuenta que la propaga-

ción *in vitro* de este frutal se dificulta por la gran exudación fenólica de sus órganos y tejidos, y por el crecimiento y desarrollo lento (65). Para evaluar los factores que intervienen en este proceso, se compararon varios agentes antioxidantes y medios de baja, media y alta salinidad. Resultó ser más efectivo el uso de 20 mg.L⁻¹ de cisteína-HCL en el medio de cultivo, con una alta salinidad. Se combinaron varios reguladores del crecimiento y se estimuló la respuesta *in vitro* con 0.1 mg.L⁻¹ de GA₃ con BAP. Estos comprobaron que a medida que aumenta el período de almacenamiento de las nueces, disminuye el crecimiento y desarrollo de los embriones para convertirse en plantas completas.

Por otro lado, en estudios para controlar la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa Duch*), se evaluaron procedimientos de desinfección superficial con hipoclorito de sodio y el uso de antioxidantes, para controlar la contaminación y oxidación de los tejidos en este frutal (66). Se realizó un previo lavado a los explantes y posteriormente se sumergieron en alcohol (70 %) durante 10 segundos, después en una solución de cloro comercial (5.25 % de hipoclorito de sodio) en tres concentraciones (10, 20 y 30 %), durante 10, 20 y 30 minutos, y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril.

El tratamiento donde mayor porcentaje de supervivencia se obtuvo fue el de la concentración de 20 % de cloro comercial y un período de inmersión de 20 minutos. Para evaluar el efecto de los antioxidantes, se le agregó previo a la siembra 4 g.L⁻¹ de cisteína, 150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico y resultó ser más efectiva la adición de 4 g.L⁻¹ de cisteína en presencia de luz.

Se han realizado otros estudios, con el objetivo de aislar e identificar los géneros de hongos contaminantes presentes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango (*Mangifera indica*), para con-

trolar y manejar la contaminación en la especie (67). Los explantes que procedían de plantas adultas cultivadas en el campo, se cubrieron 15 días antes con bolsas de papel y plásticas transparentes, con algunas perforaciones y recibieron las aplicaciones de 4 g.L⁻¹ de Ridomil cuatro días antes de la siembra.

Para la desinfección superficial se emplearon diferentes fungicidas o antibióticos como Benomil y Rifampicina, además de alcohol etílico (70 %) e hipoclorito de sodio (5.25 %); posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada y se sembraron en un medio Murashige y Skoog complementado con 1 mg.L⁻¹ de vitaminas, tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 20 g.L⁻¹ de sacarosa solidificado con agar y pH de 5,8. Luego de la incubación de los segmentos nodales *in vitro*, a los ocho días, se detectaron dos especies de hongo: *Alternaria* sp y *Curvularia* sp, este último en mayor porcentaje, por lo que la desinfección empleada no logró controlar la contaminación.

Estos demostraron lo señalado por Ramírez (68), acerca de la necesidad de añadir en el medio de cultivo fungicidas o antibióticos, para contrarrestar el efecto de hongos y bacterias, y el empleo de otras alternativas que permitan disminuir su frecuencia de aparición.

En relación con lo planteado anteriormente, otros lograron retardar la presencia de contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de ápices de mango, colectados durante la época de seca, al adicionar al medio de cultivo fungicidas y antibióticos (69).

CONCLUSIONES

⊕ Los frutales constituyen una rica fuente de alimentación en la dieta humana, ya sea por el contenido nutricional de sus jugos o el efecto benéfico en la salud (en la prevención de procesos degenerativos); además, juegan un papel fundamental en la absorción del CO₂ y el incremento de la biodiversidad.

- ⊕ La embriogénesis somática y organogénesis son técnicas de gran importancia práctica, que se han convertido en un prerrequisito indispensable en la regeneración de los frutales.
- ⊕ El cultivo de embriones cigóticos, anteras y meristemas, así como el empleo de los SIT, son técnicas que deben ganar un mayor peso y relevancia en la micropropagación de especies frutales.
- ⊕ La conservación en medio de mínimo crecimiento resulta muy efectiva en frutales que se encuentran amenazados como el marañón.
- ⊕ La aplicación de marcadores moleculares para la caracterización e identificación de las variedades de frutales contribuye a la multiplicación y el mejoramiento genético.
- ⊕ La aplicación de técnicas biotecnológicas en los frutales, a pesar de estar limitada por la oxidación fenólica de sus órganos y tejidos y por la contaminación microbiana, constituye una vía valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de especies frutales de interés.

REFERENCIAS

1. Larocca, F. La dieta humana. Las frutas. Consultado [15-4-2008]. Disponible en: <<http://www.monografias.com/trabajos50/dieta-humana/dieta-humana?shtml>>.
2. Importancia de las frutas en la dieta. Consultado [15-4-2008]. Disponible en: <<http://www.frutasmanuela.com/recet/nutricion/angela.htm>>.
3. Guía médica. Fascículo 3: Grupos de alimentos. Consultado [15-4-2008]. Disponible en <<http://www.explored.com.ec/guia/fasd2.htm>>.
4. Vallín, G. y Mulen, L. Incidencia de los frutales en áreas de producción orgánica de Cuba. En: Resúmenes II Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical. *Agricultura Orgánica*, 2007, vol. 13, no. 3, p. 20-21.
5. Nichterlein, K. Workshop on mutation and *in vitro* culture techniques for the improvement of vegetatively propagated tropical food crops. Curso de investigaciones agronómicas. Universidad de Costa Rica, 2000. 56 p.
6. Sasson, A. Cultivos transgénicos: hechos y desafíos. La Habana : Editorial ELFOS Scientia, 2001. 377 p.
7. Parrot, W. La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. (6:2002:Santa Clara), 2002, p. 7-17.
8. Cevallos, M. Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto (*Coffea sp.*) mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. [Tesis de doctorado; INCA. 2000. 136 p.
9. González, M. E. Micropropagación de cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. [Tesis de doctorado]; INCA. 2003. 97 p.
10. Castillo, J.; Estévez, A.; Vargas, D.; Hernández, M.; Salomón, J.; Quiñónez, Y.; López, Y. y Arencibia, A. Detección de la estabilidad genética en especies de papa (*Solanum tuberosum* L.) conservadas *in vitro*, por largos períodos de tiempo, mediante el empleo de AFLP. En: Seminario Científico del INCA (14:2004:La Habana), 2004. 95 p.
11. Ramírez, V. M.; Urdaneta, A. y Sierralta, S. de. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 2002, vol. 19, no. 1, p. 48-55.
12. Medina, M. L. y Pagano, F. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L) tipo "Criolla Roja". *Revista de la Facultad Agronomía*, 2003, vol. 20, no. 1.
13. Hoyos, J. Frutales de Venezuela. Nativos y Exóticos. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle, Venezuela, 1994. 381 p.
14. Tisserat, B.; Esan, E. y Murashige, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.*, 1979, no. 1, p. 1-78.
15. Strassburger, E. Userdie Individuallistat der chromosomen die prophyridenfrage. *Jahrbwiss Bot*, 1978, vol. 44, p. 402-455.
16. Reinert, J. Untersuchugen Uber die morphogenese und gewebwkulturen. *Ber. Dtsch.Bot. Ges*, 1958, vol. 71, p. 15.
17. Steward, F. C.; Mapes, M. O. y Mears, K. Growth and organized development of cultured cells. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.*, 1958, vol. 45, p. 705-708.
18. Gleddie, S.; Keller, W. y Setterfield, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.*, 1984, vol. 61, p. 656-666.
19. González, M. E.; Ramos, R. y Santana, N. Efecto del ácido abscísico (ABA) en la regulación del desarrollo de los embriones somático de *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 3, p. 33-37.
20. González, O.S. Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomea batatas* (L) Lam). [Tesis de doctorado]; INCA, 2006. 120 p.
21. Benítez, D. Actividad biológica del Pectimorf sobre el desarrollo de callos de *Saccharum officinarum* L. de la variedad C 87-51. [Tesis de Diploma]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 1998. 61 p.
22. Garbey, P. Estudio del efecto del Oligopectato DP>12 en callos de *Saccharum officinarum* L. [Tesis de Diploma]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 1997. 43 p.
23. Galiana, A. Obtención y cultivo de protoplastos de cítricos. [Tesis de doctorado]; Universidad de Valencia, 1995. 161 p.
24. Megane, B. Estudio del efecto de biorreguladores cubanos en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort. ex Tan.*) mediante el uso de marcadores genéticos. [Tesis de Diploma]; Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 2007. 56 p.
25. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.

26. Carman, J. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1990, vol. 26, p. 746-753.
27. Karunarathne, S. C.; Gamage, C. y Kovoor, A. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. *J. Plant Physiol.*, 1991, vol. 139, p. 27-31.
28. Vilchez, J.A.; Albany, N.R.; Gómez, R.; Kosky, R. y García, L. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Agronomía*, 2002, vol. 19, no. 4.
29. Merkle, S. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1995, vol. 1, no. 3, p. 112-120.
30. Tisserat, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. *Plant cell culture, a practical approach*. Press Limited, 1991. 105 p.
31. Monteiro, A. Capacidade de regeneração *in vitro* de cotilédones de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.), do clone CP-76. [Tesis de Diploma]. 1996.
32. Jiménez, G. E. Cultivo de ápices y meristemas. En: *Propagación y Mejora de plantas por Biotecnología*. IBP. Santa Clara, 1998, t 1., vol. 1, p. 13-24.
33. Caso, H. O. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia*, 1992, vol. 9, p. 5-16.
34. Scocchi, D. N.; Mroginski, A. y Mroginski, E. Organogénesis directa a partir de segmentos de hojas cotiledonares de *Citrus sinensis* (L.). En: *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, 2004.
35. Otahola, V. Regeneración de plantas de parchita (*Pasiflora edulis* F. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *Bioagro*, 2000, vol. 12, no. 3, p. 71-74.
36. Schenk, R. U. y Hildebrandt, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany*, 1972, vol. 50, p. 199-204.
37. Leva, A. y Falcone, A. Propagation and Organogenesis *In Vitro* of *Anacardium occidentale* L. ISCH. En: *Acta Horticulturae* 280: I International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. Consultado [20-1-07]. Disponible en: <<http://www.actahort.org> Hosted por K.U. Leuven © ISHS>.
38. Litz, R. E. Cultivo de embriones y óvulos. En: *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CECI:CIAT, 1991.
39. Krikorian, A. D. Propagación clonal *in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CECI:CIAT, 1991.
40. Guerra, M. P.; Pescador, R.; Dal Vesco, L. L.; Nodari, R. O. y Ducroquet, J. P. *In vitro* morphogenesis in Feijoo sello viana: somatic embryogenesis. *Proc. Int. Sym. Myrtaceae*. [en línea]. *Acta Hort*, 1996, vol. 452, p. 27-35.
41. Rodríguez, N. N.; Guedes, L.; Guede, A.; Aguilera, N. y Borge, M. Cultivo *in vitro* de embriones zigóticos de *Anacardium occidentale* L. *Alimentaria. Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 2003, vol. 345, p. 111-115.
42. Ramírez, M. C.; Salazar, E. G. y Amarte, G. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L.) *Revista de la Facultad Agronomía*, 1998, vol. 15, p. 211-221.
43. Margara, J. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Madrid: Mundi prensa, 1988, 232 p.
44. Zok, S. y Dublín, P. Multiplication *in vitro* par cultura d' apex chez *Coffea Arabica* 2: action solutions minerales de regulateurs de croissance. *Café, Cacao, The*, 1991, vol. 4, no. 35, p. 245-256.
45. González, M. E.; Morejón, R. y Portilla, M. Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo *in vitro* de ápices *Coffea arabica* L. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 2, p. 37-40.
46. Chu, C. C. Haploids in Plant Improvement. En: *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*. New York: Academic Press, 1982. p. 129-157.
47. Bajaj, Y. P. S. *In vitro* productions of haploids. En: *Handbook of Plant Cell Culture*. New York: Mac Millan, 1983, p. 228-287.
48. Victoria, P. A. Obtención de plántulas de arroz mediante el cultivo de anteras. [Tesis de Maestría]; UH, 1997. 56 p.
49. Benega, R.; Isidró, M.; Cisneros, E.; Daquinta, M.; Companioni, L. y Martínez, J. Inducción de callos en anteras de piña. *Cultivos Tropicales*, 1996, vol. 17, no. 1, p. 72-74.
50. Valentin, P.; Bueno, D.; Cerreia, D. y Fialho, J. Meios de cultura para o crescimento *in vitro* anteras de Cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L). EMBRAPA Agroindustria Tropical. Laboratorio Biotecnología Vegetal, 2006.
51. Colmenares, M. y Giménez, C. New strategies for shoot induction in *Musa*. En: *IV Latin-American meeting on plant biotechnology*. REDBIO. Goiania-Goias, (4:2001: jun:Brasil), 2001.
52. Centre de cooperation internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD). Recipiente con Inmersión temporal para cultivo de tejidos de plantas. Las principales ventajas del sistema RITA, 1993.
53. Colmenares, M. y Giménez, C. Multiplicación *in vitro* *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad Agronomía*, 2003, vol. 20, no. 4, p. 468-477.
54. Páez, J. y González, R. *In vitro* storage of two potato varieties (*Solanum tuberosum* L.). *Under Minimal Growth Conditions*, 2001, vol. 12, no. 1, p. 121-129.
55. Rodríguez, N. N.; Guedes, L.; Infante, Z.; Aguilera, N. y Borge, M. Conservación *in vitro* de *Anacardium occidentale* L. *Alimentaria. Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 2003, vol. 345, p. 123-128.
56. Bertrand, D. A.; Noiro, M. y Charrier, A. Slow growth conservation *in vitro* of coffee /*Coffea*/spp. 2. Influence of reduced concentrations of sucrose and low temperature. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Holanda*, 1992, vol. 31, no. 2, p. 105-110.
57. Azofeifa, A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agroonomía Mesoamericana*, 2006, vol. 17, no. 2, p. 221-241.
58. Coto, O.; Comide, M. T.; Rodríguez, M.; Hernández, I.; Canales, E.; DePrada, F. y Pérez, G. Diversidad genética basada en marcadores moleculares de una colección de clones del complejo *Saccharum* utilizados en el programa de introgresión de la caña de azúcar en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 26, no. 1, p. 41-48.

59. Albany, N.; Vilchez, J.; Nava, A.; González, M. y Rincón, C. de. El análisis de conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforéticos en *Psidium* ssp. *Revista Facultad Agronomía*, 1998, vol. 15, p. 142-152.
60. Archak, S.; Gaimad, A. B.; Gautam, D.; Rad, E. V.; Swamy, K. R.; Kamihaloo, J. L. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L). *Accessions of India Genoma*, 2003, vol. 46, no. 3, p. 362-369.
61. Aukar, A. P.; Lemos, E. G. y Oliveira, J. C. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. *Brasileira de Fruticultura*, 2002, vol. 24, no. 3, p. 738-740.
62. Brown, J.; Laurentín, H. y Dávila, M. Genetic relationship between *Annona muricata* L. accessions using RAPD markers. *Fruits*, 2003, vol. 58, no. 5, p. 255-259.
63. Alvarado, Y. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998, p. 81-104.
64. Niedz, R. P. y Bausher, M. G. Control *in vitro* contamination of explants from greenhouse and fields grown trees. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2002, vol. 38, p. 468-471.
65. Aguilera, N.; Rodríguez, N. N.; Guedes, L.; Borges, M. e Infante, Z. Factores que afectan al crecimiento y desarrollo *in vitro* de embriones zigóticos de *Anacardium occidentale* L. *Alimentaria*, 2003, vol. 349, no. 7, p. 117-122.
66. Sánchez, M. C. y Salverría, J. L. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch). *UDO Agrícola*, 2004, vol. 4, no. 1, p. 21-26.
67. Isea, F.; Escalante, M.; Urdaneta, J.; Ramírez, V. M. Presence of contaminating fungi in breeding *in vitro* mango nodal segments (*Mangifera indica* L). *Revista Facultad de Agronomía*, 2004, vol. 21, no. 1, p. 193-199.
68. Ramírez, V. M.; Santos, R. e Isea, F. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Revista Facultad de Agronomía*, 2000, vol. 17, p. 217-225.
69. Borges, L.; Morales, H.; Valero, Z.; Santos, R.; Rincón C. del y Villar A. del. Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) var. Hadem. En: Jornada Científico Técnica. Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia. (8:1997:Maracaibo), 1997. 102 p.

Recibido: 12 de junio de 2008

Aceptado: 19 de septiembre de 2008

DIPLOMADOS

Precio: 2000 CUC

Uso y manejo de los biofertilizantes

Coordinador: Dr.C. Nicolás Medina Basso

Duración: 1 año

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (47) 86-3773
Fax: (53) (47) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu