

Revisión bibliográfica

EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO *In Vitro* DE FRUTALES PERENNES

Yuniet Hernández y María E. González

Yuniet Hernández, Reserva Científica y Dra.C. María E. González, Investigadora Auxiliar del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32700

E-mail: yuniet@inca.edu.cu

RESUMEN. Los frutales constituyen hoy en día una fuente inagotable de riquezas, no solo por su aceptación en varias regiones del mundo, sino también por los elementos nutritivos que aportan a la salud humana. A nivel mundial, existen frutales con muy bajas poblaciones y, en ocasiones, son casi nulas, debido a la poca atención en las áreas donde estas especies son cultivadas, su débil variabilidad genética y la difícil propagación, por las características específicas que presentan muchas de estas especies. La propagación natural de los frutales leñosos es generalmente mediante semillas, las que frecuentemente se producen en poca cantidad y son fuertemente dañadas por parásitos y depredadores, razón por la cual es un factor limitante para la obtención de material para futuras plantaciones. Las técnicas biotecnológicas pueden jugar un rol importante, para el suministro adecuado de vitroplantas como material de plantación. La germinación *in vitro* posibilita dicho proceso en condiciones asépticas y controladas en cualquier época del año, permitiendo disminuir el proceso de germinación así como obtener plántulas en condiciones fitosanitarias apropiadas para trabajos de cultivo *in vitro*. Sin embargo, para el establecimiento exitoso de estas especies, se hace necesario prevenir y controlar la contaminación microbiana y oxidación fenólica, ya que constituye uno de los problemas más graves en la micropropagación de frutales leñosos.

Palabras clave: frutales, contaminación microbiana, oxidación fenólica, cultivo *in vitro*

ABSTRACT. Nowadays, fruit trees constitute an inexhaustible source of wealth, not only for its acceptance in various regions of the world but also for the nutrients they contribute to human health. Fruit tree populations are very low all over the world; even they are sometimes almost inexistent, since these cultivated areas are poorly attended, besides their weak genetic variability and hard propagation, as a result of the specific characteristics of many of these species. The natural propagation of woody fruit species is usually by seeds, which are often released in small amounts and strongly damaged by pests and predators; therefore, it is a limiting factor for obtaining future planting material. Biotechnological techniques can play an important role for the adequate supply of vitroplants as planting material. *In vitro* germination makes this process possible under aseptic and controlled conditions at any season of the year, enabling to reduce germination process and obtain seedlings under appropriate phytosanitary conditions for *in vitro* culture studies. However, for the successful establishment of these species, it is necessary to prevent and control microbial contamination and phenolic oxidation, as it is one of the most serious problems in woody fruit tree micropropagation.

Key words: fruit trees, microbial contamination, phenolic oxidation, *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

Los frutales constituyen hoy en día una fuente inagotable de riquezas, no solo por su aceptación en varias regiones del mundo, sino también por los elementos nutritivos que aportan a la salud humana (1). A nivel mundial, existen frutales con muy bajas poblaciones y, en ocasiones, son casi nulas, debido a la poca atención en las áreas donde estas especies son cultivadas y a la difícil propagación, por las características específicas que presentan muchas de estas especies (2).

Es conocido que muchas especies, entre ellas las sapotáceas, se encuentran en una difícil situación, llegándose a considerar potencialmente amenazadas, por la gran pérdida que cada año sufren las pocas áreas destinadas a ellas, las cuales han quedado reducidas al estrecho marco de patios y jardines de viviendas (3).

Muchas de las especies de árboles tropicales que se cultivan extensivamente se propagan por medio de semillas; sin embargo, no todas las especies valiosas producen semillas que puedan utilizarse fácilmente para este propósito. Muchos árboles tropicales florecen y fructifican esporádicamente o producen cantidades pequeñas de semillas, que con frecuencia son fuertemente dañadas por parásitos y depredadores (4). Muchas de ellas son de tipo recalcitrante, de vida corta, frágil y difícil de manejar o almacenar. Algunas requieren condiciones peculiares de germinación que son desconocidas, difíciles de obtener en un vivero o en una cámara de germinación; además, las plántulas que se obtienen de las semillas de los árboles tropicales a veces necesitan mucho tiempo para crecer y su maduración puede tomar toda una vida (5), razón por la cual en plantas leñosas se recurre frecuentemente a la selección clonal o vegetativa, pues las prácticas de entrecruzamiento, hibridación y selección que se utilizan en los cultivos de plantas anuales son difíciles de aplicar y solo se obtienen resultados a muy largo plazo (4).

La micropropagación y propagación vegetativa permiten emplear técnicas de selección y mejoramiento de las características favorables de estas plantas por medio de la selección clonal (6). Las características que pueden mejorarse cubren un amplio rango de posibilidades; por ejemplo, la resistencia de las plantas a las variaciones de temperatura, la sequía, a crecer en suelos pobres o con características desfavorables, como acidez o alcalinidad excesiva, salinidad alta o saturación de humedad. También puede mejorarse el rendimiento del forraje y los frutos, su sabor y calidad nutricional, la velocidad de crecimiento, calidad de la madera producida y concentración de compuestos secundarios valiosos como: sustancias químicas, látex, gomas, etc. (4). Además, permite la obtención de cultivares totalmente libres de agentes patógenos, incluidos los virus y obtener semillas artificiales por medio de la técnica de embriogénesis somática y encapsulado (7).

Actualmente, las técnicas de cultivo *in vitro* se están aplicando al desarrollo de una serie de especies frutales de clima subtropical, dentro de ellas la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), el aguacate (*Persea americana* Mill.), el mango (*Mangifera indica* L.), la carambola (*Averrhoa carambola* L.), el litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) y la papaya (*Carica papaya* L.), entre otras. El cultivo de meristemos, anteras y embriones cigóticos y somáticos han sido los más empleados para la multiplicación, el rescate y la conservación de estas especies (8).

En general, la aplicación de métodos de cultivo de tejidos se considera la forma más efectiva para obtener poblaciones morfológicas y genéticamente estables de frutales (9). Pero para ello se hace necesario establecer métodos eficientes para el control de la contaminación microbiana y oxidación fenólica, pues son las principales dificultades que se presentan durante la fase de establecimiento, debido precisamente a las características propias de los árboles frutales y explantes a utilizar (10); dentro de ellos

las semillas, material comúnmente utilizado con estos fines, al cual es necesario prestar especial atención.

INFLUENCIA DE LA LATENCIA Y EL ALMACENAMIENTO PROLONGADO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS ORTODOXAS Y RECALCITRANTES

La semilla es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones de plantas, la reforestación, conservación del germoplasma vegetal y recuperación de especies valiosas sobre-explotadas (4).

Existen diferentes clasificaciones de semillas, según la duración potencial de su viabilidad (11). En este sentido, las semillas de frutales leñosos se clasifican en ortodoxas y recalcitrantes.

Las semillas ortodoxas son aquellas que se caracterizan por resistir la desecación por debajo del 5 % del contenido de humedad y poder ser almacenadas a largo plazo (4). La latencia morfológica y morfofisiológica es uno de los principales factores que afecta la germinación de este tipo de semilla y ha sido reportada en diversos géneros y especies de la familia *Annonaceae* (12). La latencia morfológica ocurre en semillas con embriones rudimentarios y laminares, en las cuales la mayoría de la simiente está ocupada por el endospermo y el embrión corresponde aproximadamente al 1 % del volumen de la unidad de propagación sexual (13), mientras que en la latencia morfofisiológica, adicionalmente al embrión rudimentario, un mecanismo fisiológico inhibe la germinación de la semilla (12, 14), por lo que hay que emplear protocolos de estratificación (15), que en algunos casos pueden reemplazarse por la aplicación de ácido giberélico (AG_3).

Se ha reportado latencia morfológica en especies de anón de los géneros *Cyathocalix*, *Rollinia*, así como en las especies *Annona squamosa* y *Annona cracifolia*, y morfofisiológica en taxa de los géneros *Goniothalamus*, *Mitrephora*, *Monocarpia*, *Paeunthus*, *Polyanthia*, *Xylopi*, *Unonopsis* y *Annona*, específicamente en *Annona coriacea* y *Annona spraguei* (12).

Se plantea que el embrión de las semillas de chirimoya es rudimentario y muy pequeño, entre 3 y 4 mm (16). En correspondencia con esto, algunos informaron en *Annona crasiflora*, especie con latencia morfológica, un crecimiento de los embriones desde un tamaño inicial de 1,6 hasta 6,0 mm previo a la germinación (17). Cabe señalar que en un estudio anatómico de algunas *Annona*, entre ellas la guanábana, se observó que los embriones, cuando tienen alrededor de 3 mm, presentan un patrón de organización definido, sin que se aprecie un tejido meristemático visible entre los dos cotiledones en el ápice; este es evidente en la parte terminal del epicótilo al lograr el embrión 7 mm, pero aún las células son inactivas en cuanto a elongación y división (18). Lo anterior evidencia la necesidad del crecimiento de los embriones, hasta alcanzar un tamaño en el que puede tener lugar la germinación, lo que implica que las células meristemáticas estén activas.

Contrario a las ortodoxas, las semillas recalcitrantes son aquellas que toleran la deshidratación entre 15 y 50 % de humedad (19), pero no pueden almacenarse por largos períodos de tiempo, pues el embrión se contrae y se pierde su poder germinativo (20). Especies como el níspero (*Manilkara sapota* L.), zapote (*Pouteria sapota* Jacq.) y canistel (*Puteria campechiana* Bahni.) poseen semillas con tales características, es decir, no mantienen el poder germinativo por un largo período una vez extraídas de los

frutos, lo que se debe a que las semillas recalcitrantes no están condicionadas, ni estructural ni fisiológicamente, para resistir la desecación ni el frío, y al tratar de almacenarlas se presentan los siguientes problemas: daños en la estructura celular provocados por desecación cuando su contenido de humedad se reduce por debajo del 20 %; daños por congelación provocados por la formación de cristales al almacenarse con altos contenidos de humedad y problemas asociados al almacenamiento hermético en una condición húmeda, que puede provocar la falta de oxígeno y contaminación microbiana (21).

Algunos atribuyen este comportamiento en la familia *Sapotaceae* a la latencia de las semillas y a dificultades con la absorción de agua y oxígeno, que se oponen al hinchamiento y crecimiento del embrión, lo cual se acentúa con el período de almacenamiento de las semillas, ya que los embriones reciben con mayor dificultad las sustancias energéticas de reservas endógenas (22, 23).

De los escasos trabajos publicados, otros coinciden en que los bajos porcentajes de germinación que se logran en estas especies y la rápida pérdida del poder germinativo se deben a la drástica reducción de humedad en la semilla (24). Algunos vinculan este hecho con una coagulación lenta de las proteínas del protoplasma y a que las sustancias reguladoras que intervienen en la respiración pierden su actividad; de este modo se afecta la vitalidad del embrión y es por ello que a medida que aumenta el período de almacenamiento disminuye el porcentaje de germinación (25).

Este fenómeno se ha encontrado, incluso, en semillas ortodoxas como las de *Anacardium occidentale*, donde los porcentajes de germinación han resultado superiores en el momento de ser cosechadas y sembradas, que posterior a su conservación durante períodos relativamente cortos (25). En correspondencia con lo anterior, las semillas de la familia *Sapotaceae* deben ser almacenadas el menor tiempo posible, pues en la medida que se incrementa su conservación, se desecan con relativa facilidad y se reduce su capacidad germinativa hasta desaparecer (26).

En la germinación de la semilla del zapote no solamente influyen negativamente los factores hasta ahora mencionados, pues con alta frecuencia se registran germinaciones prematuras dentro del fruto, sin que se haya extraído su semilla. En este caso, el embrión se daña con extrema facilidad y al sembrarse la semilla no generará una planta. En otras ocasiones, se han encontrado síntomas de un posible aborto embrionario, como un intento de germinación, pero acompañado de un rápido necrosamiento que se inicia por el extremo de la radícula (27).

Los problemas asociados a la propagación por semillas constituyen factores limitantes, para la obtención del material requerido para las plantaciones y ante esta dificultad las técnicas biotecnológicas pueden desempeñar un papel importante, para garantizar ante determinadas condiciones un suministro adecuado de vitroplantas como material de plantación (28).

CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN EL CULTIVO *In Vitro* DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales resulta una herramienta potente, básica y necesaria, en la propagación de plantas que presentan dificultad para multiplicarse vegetativamente, abarcando una serie de técnicas para su manipulación y control (28). Básicamente consiste en el cultivo sobre un medio nutritivo artificial en condiciones asépticas. Así, las plantas completas o partes de ellas (explantes), como: semillas,

embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, pertenecientes a diversas especies vegetales, son cultivadas *in vitro*. Dichas técnicas permiten controlar los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo de la planta, como son: división celular, germinación, brotación, enraizamiento, floración y fructificación (8), además de que pueden desempeñar un papel importante en el suministro adecuado de vitroplantas como material de plantación.

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (29).

Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras (30, 31), denominados "vitropatógenos", aunque también existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips).

El término vitropatógeno ha sido usado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*, mientras que el término patógeno ha sido confinado para describir a un organismo que causa enfermedad a las plantas cultivadas en el campo (32).

Se ha sugerido que los vitropatógenos pueden ser dañinos para el cultivo de tejidos vegetales, ya que compiten con el explante por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos (31), aunque en la actualidad no se encuentran muchos trabajos en la literatura científica que expliquen el mecanismo de acción de los contaminantes, que los hacen perjudiciales para las plantas *in vitro* (32). Algunos encontraron que la inoculación de plantas *in vitro* de *Hemerocallis* con la bacteria no patógena *Lactobacillus plantarum*, un contaminante frecuente del cultivo de tejidos, causaba una disminución del coeficiente de multiplicación, seguido de un rápido deterioro de los cultivos (33). Ellos refirieron, además, que esto coincidió con el incremento del número de bacterias y la concentración de ácido láctico en el medio de cultivo. Ellos demostraron que el efecto perjudicial de *Lactobacillus plantarum* era un resultado directo de la producción de ácido láctico, más que del efecto general de la disminución del pH. Los coeficientes de multiplicación de plantas infectadas con contaminantes bacterianos latentes pueden mantenerse inalterables, pero reiteradamente se ha referido que decrecen (33, 34, 35). No obstante, en el cultivo de células y tejidos vegetales, el efecto de la presencia de microorganismos no ha sido ampliamente examinado (36).

Las bacterias son los contaminantes *in vitro* más comunes y ocasionan serios problemas, porque pueden ser sistémicas así como difíciles de detectar y eliminar (30, 31, 37). Estos microorganismos escapan a los efectos de los esterilizantes superficiales y pueden ser inter o intracelulares. Entre los últimos, se encuentran los virus, viroides y muchos géneros bacterianos como: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* (38). Su distribución puede ser localizada o sistémica por xilema o floema (39, 40). Estos contaminantes no se manifiestan en los primeros subcultivos, ya que la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas de los medios de cultivo pueden inhibir su crecimiento. Debido a este efecto inhibitorio, muchos microorganismos requieren un período de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestar su presencia; esto ocurre por lo general en la fase de multiplicación (37, 38).

Entre las principales fuentes de contaminación bacteriana se citan los explantes, el ambiente de los locales de trabajo, los operadores y las técnicas deficientes de esterilización. Además, los microorganismos pueden diseminarse por ácaros, trips y hormigas (30, 41, 42). El ambiente de los locales de trabajo es una fuente de contaminación, ya sea directa o indirectamente. Se plantea que a través de las corrientes de aire, las partículas del suelo cargadas de esporas y células de microorganismos son arrastradas y penetran por los acondicionadores de aire, son transportadas e introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas.

Del mismo modo, el tipo de cultivo (anual o perenne), la forma de propagación (sexual o asexual) y las condiciones climáticas influyen en la gravedad de las contaminaciones. Las condiciones climáticas en zonas tropicales favorecen el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos, que tienen un efecto negativo sobre los explantes (43). En la caña de azúcar, que es un cultivo perenne que se multiplica asexualmente, se ha determinado una abundante flora bacteriana en todos los tejidos de la planta y en los haces conductores. En relación con lo anterior, se demostró que la caña de azúcar puede ser colonizada endofíticamente por bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Azospirillum*, que se encuentran en la parte aérea de la planta, incluido el ápice (44, 45, 46).

Como contaminantes *in vitro* de plantas, se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, entre otros (30, 47, 48), y como los microorganismos fungosos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos se encuentran los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* (33, 49).

Se ha detectado la presencia de hongos contaminantes en ápices de plantas adultas de *Annona muricata* (50), los cuales correspondieron a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryodiplodia*, *Curvularia* y *Helmithosporium*. Otros identificaron los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (51), durante el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava*. En el cultivo *in vitro* de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.), se identificaron como géneros de hongos contaminantes a *Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. (52); sin embargo, en segmentos nodales solo se han identificado los géneros *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp., siendo este último el que mayor número de explantes contaminados presentó, señalándose que las diferencias con respecto al resultado anterior puede atribuirse al procedimiento de desinfección, el explante seleccionado y la época del año, entre otras causas (53).

Estrategias para controlar la contaminación microbiana. Los microorganismos epífitos o endófitos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo *in vitro* con el explante inicial. Diferentes autores señalan que frecuentemente es difícil identificar la fuente de contaminación y que han desarrollado protocolos para reducir la presencia de estos microorganismos contaminantes, que pueden encontrarse en la superficie, en el interior del explante o en ambos sitios, siendo los de la superficie más fácil de eliminar (54, 55).

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana (49). Existen varias estrategias para controlar y manejar la contaminación, que incluyen la prevención mediante la selección y el tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial del explante y la identificación de los microorganismos contaminantes, el control de la

contaminación a través del uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemos (56).

- Formas y métodos de desinfección

Los métodos de desinfección utilizados en la fase de establecimiento no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*. Algunos son capaces de permanecer en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y así quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (30).

Las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* se han referido como causantes de las mayores pérdidas en las primeras fases de la micropropagación, lo cual se atribuye a que son las bacterias más abundantes en la superficie aérea de las plantas en el suelo (31). Algunos las consideran como microorganismos indicadores de la ineficiente desinfección de los explantes en la fase de establecimiento (57). Atendiendo al criterio de Parkinson (58), antes de que los protocolos de desinfección puedan ser usados con efectividad, se requiere conocer la microbiota asociada con las plantas que serán micropropagadas, pues a partir del diagnóstico de los principales microorganismos patógenos o contaminantes se pueden eliminar o colocar en tratamiento las plantas contaminadas (59).

La presencia de microorganismos es detectada en la fase de establecimiento *in vitro*, sobre todo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas y enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental (60). Uno de los procedimientos para disminuir los riesgos de la contaminación en el establecimiento de los explantes es la aplicación de fungicidas, combinados o por separado, durante el ciclo de crecimiento de las plantas donantes (49, 59). Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta este tipo de tratamientos es que se producen lesiones (de magnitud variable) a los tejidos de la planta y, en ocasiones, pueden dejar residuos tóxicos en sus tejidos.

Algunos estudios sugieren que en plantas donantes de *Eucalyptus grandis*, más del 50 % de los hongos filamentosos que conformaban su microbiota fue eliminado con la aplicación de fungicidas comerciales, combinando fungicidas preventivos de contacto Mancozeb pH 8.0 (10 g.L⁻¹) y oxiclورو de cobre pH (10 g.L⁻¹) con fungicida curativo de acción sistémica Benomil pH 5.0 (2 g.L⁻¹) (61). Otros investigadores, con el empleo del complejo carbendazim-β-ciclodextrina, en concentraciones variables, demostraron que era posible inhibir el crecimiento micelial de los contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum* (62).

El tamaño del explante es otra de las causas que incrementa la presencia de contaminantes *in vitro*, pues mientras mayor sea el explante, más difícil es de desinfectar (63). Del mismo modo, las irregularidades ubicadas en la superficie del explante afectan el éxito de la desinfección superficial, ya que pueden servir de depósito de esporas y polvo, y los productos empleados no logran llegar y desinfectar las áreas de interés (41, 55).

En *Annona muricata* L., al evaluar el efecto del tipo de explante (ápice y segmentos nodales) sobre el establecimiento *in vitro* de esta especie, se observó que el porcentaje de contaminación por hongos aumentaba como tendencia general, a medida que la posición de los segmentos nodales se alejaba del ápice (64). Se infiere que esto puede tener relación con el tamaño del explante, el cual era mayor en los correspondientes a

las posiciones nodales 9, 8, 7 y 6 o bien porque estos a la vez son explantes más viejos y la propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere la utilización de explantes jóvenes (65).

Para la desinfección del explante inicial, se han empleado comúnmente soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones entre 0.5 y 5 % (66). Las soluciones de hipoclorito de calcio (CaOCl) son tan efectivas como las de sodio (67). De forma general, se plantea que la escisión del explante es recomendable realizarla después de la desinfección, para eliminar tejidos que han sido dañados por la solución de hipoclorito.

La aplicación de una doble desinfección con hipoclorito de sodio o calcio, seguido del enjuague con agua destilada y esterilizada por dos a tres minutos, ha sido empleada por varios investigadores. Esta permite que las esporas que no puedan ser destruidas inicialmente, pasen a formas vegetativas y durante la doble desinfección sean eliminadas fácilmente de los explantes primarios, lo que conlleva a un menor porcentaje de contaminación microbiana (68).

- Métodos de detección de vitropatógenos

Los métodos de detección de vitropatógenos constituyen una herramienta muy importante, en el momento de planificar cultivos *in vitro* y para combatir enfermedades de poblaciones vegetales. Saber con qué patógeno se está lidiando es el paso más importante para eliminarlo. Muchos vitropatógenos tienen asociaciones naturales con las plantas, por lo que las pruebas de calidad también deben realizarse para material vegetal, del cual no se tenga absoluta certeza de que está libre de patógenos (69).

Varios investigadores y productores en biotecnología de plantas a menudo utilizan la observación visual de sus cultivos, como método para saber si están libres o no de contaminantes (32). Como se refiere anteriormente, en algunos casos los signos de contaminación solo aparecen después de que las plantas han sido subcultivadas en varias oportunidades. Esto puede estar relacionado con el crecimiento lento de las bacterias en medios de cultivo para plantas y a su estado de latencia (30). Por esta razón, se precisa de métodos rápidos y seguros de detección temprana; entre los más utilizados se encuentran rozar la superficie cortada del explante sobre un medio de cultivo bacteriológico durante los subcultivos (70) y la transferencia de fragmentos de material vegetal a medios de cultivos bacteriológicos (71). Se ha referido también la modificación de los medios de cultivo de las plantas con la adición de componentes de medios para el cultivo de bacterias (72), agua de coco (73) y variando el pH (74). Además, los métodos turbidimétricos han sido utilizados por algunos autores.

Los métodos de detección de vitropatógenos se dividen en dos grandes grupos: detección de bacterias y hongos, y detección de virus. Los procesos de detección de virus son considerados por separado de los empleados para bacterias y hongos, puesto que dadas las características de los virus, se necesitan técnicas especiales (69).

- Uso de sustancias antimicrobianas

Ha sido muy discutido el empleo de antibióticos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, para controlar la contaminación bacteriana. Existen diferencias de opinión con respecto a la factibilidad de su uso. El éxito de su aplicación en el medio de cultivo varía según los criterios, métodos de apreciación, microorganismos, etc. y depende en gran medida del desarrollo de un buen protocolo (48). Así, por ejemplo, se ha planteado que los antibióticos no sustituyan las técnicas de asepsia y deben ser empleados solo cuando estas son inadecuadas, preferentemente como tratamiento profiláctico más que para tratar la infección. En este mismo se ha hecho énfasis en que, para que un compuesto antimicrobiano pueda ser usado en el medio de cultivo, debe cumplir las siguientes condiciones: ser soluble, estable, no afectar el pH ni el medio de cultivo, mínimos efectos secundarios (no fitotóxicos), amplio espectro, ser bactericida,

debe ser usado sistemáticamente y en combinación con otras sustancias antimicrobianas, tener un modo de acción que no permita a la bacteria desarrollar resistencia y preferiblemente no ser utilizado en medicina clínica (75). Algunos han manifestado el criterio de que el empleo de antibióticos solamente se justifica, en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que su alta especificidad implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos. Además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivos y pueden ser metabolizados por los explantes (41).

El uso de ciertos antibióticos puede eliminar grupos discretos y particulares de bacterias, pero en la mayoría de los casos se necesitan sustancias de un espectro más amplio. El empleo de agentes químicos desinfectantes como el Basamid, Brassicol, Benlate, PCNB o mezclas de ellos permite la eliminación de la sarna común (*Streptomyces scabies*) de la papa (76). Otros investigadores, en la micropropagación de especies vegetales, obtuvieron experiencias con el uso de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano (77). Estas sustancias son antibióticos como la rifampicina, cefotaxima, gentamicina, estreptomina, ampicilina, etc. También se han empleado otras sustancias como extractos filtrados de microorganismos. Entre estos, el extracto de *Pseudomonas fluorescens* ha mostrado una elevada actividad antimicrobiana (78). El G1 (1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno) es un producto desarrollado en Cuba, con acción de esterilizante químico, que se incorpora a los medios de cultivo para eliminar los contaminantes microbianos (37, 79). El uso de nitrato de plata en los medios de cultivo permitió controlar el crecimiento de contaminantes no patogénicos, sin afectar el crecimiento en plántulas de tomate (80).

OXIDACIÓN FENÓLICA

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.) (81).

Frecuentemente, el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas, como el caso de la mayoría de las especies frutales, se ve impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos (82, 83, 84). El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y, en consecuencia, inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (85).

Los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos; es por eso que la oxidación fenólica es un problema grave en el cultivo *in vitro* de las especies leñosas, entre ellas la familia *Annonaceae*, donde se ha logrado disminuir este problema con el uso del sombreado (86, 87, 88).

Actualmente, se hace énfasis en la importancia del tratamiento del material donante (84, 89) y su efecto de origen (90, 91), como medio para controlar el oscurecimiento oxidativo y sus consecuencias en la supervivencia de los explantes al momento de establecerlos *in vitro*.

Algunos refieren que el mecanismo de oxidación fenólica e inhibición del crecimiento en plantas leñosas puede ser controlado por los niveles de irradiación, recibidos por las plantas madres, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que

participan en la síntesis y oxidación de los fenoles es inducida por la luz. Lo anterior ha sido demostrado en el cultivo de la vid, pues se pudo evidenciar una mayor viabilidad en los meristemos apicales que provenían de material crecido bajo sombra (89), por lo que se recomienda el sombreado como una técnica efectiva para reducir los niveles de fenoles y la actividad de la enzima polifenoloxidasas e incrementar la viabilidad de los explantes (90).

En guayabo, la protección solar de las ramas de la planta disminuyó el contenido de compuestos fenólicos en los explantes (88). En este mismo cultivo, se registró un 100 % de brotación de los explantes sin problemas de oscurecimiento, cuando la planta madre fue sombreada (92).

Se infiere que existe una relación directa entre la oxidación y la posición que ocupa el nudo en la rama, ya que en cultivos como la uva (*Vitis vinifera* L.), se ha detectado un efecto significativo de la posición de los ápices, determinando un menor contenido de compuestos fenólicos en los laterales que en los terminales, con la consecuente reducción de la oxidación (84).

La síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en los tejidos maduros que en los jóvenes y está directamente influida por el contenido de sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo (93). Se han utilizado varios métodos, con el fin de controlar la oxidación fenólica. Entre ellos cabe mencionar el pre-tratamiento de explantes con antioxidantes (94, 95), la incorporación de antioxidantes (94) o carbón activado (96) al medio nutritivo, el cultivo de explantes provenientes de las zonas en estado de crecimiento activo y la realización adecuada de subcultivos frecuentes (93), el subcultivo frecuente en medio fresco (97), la inmersión en agua destilada estéril algunas horas antes de la siembra *in vitro* (98) y la modificación de las condiciones ambientales *in vitro* al iniciar los cultivos en oscuridad (99) o a bajas temperaturas (93), lo cual ha disminuido el oscurecimiento de explantes.

Las enzimas involucradas en la biosíntesis y oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja (100).

En el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria Xananassa* Duch.), la aplicación de antioxidantes tuvo un efecto marcado en la supervivencia de explantes y los mejores resultados fueron del tratamiento con cisteína, la cual no previene la oxidación sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que pueda formarse (100). Además, como es un aminoácido, puede inducir un rápido desarrollo del explante, al ofrecer nitrógeno orgánico rápidamente disponible para suplir sus requerimientos (101).

Los antibióticos son fuentes exógenas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los organismos, por lo que los eventos de reconocimiento ante cualquier señal de las antes mencionadas conducirían a la acumulación de ROS y, en particular, del anión superóxido (O_2^-) que es poco reactivo y solo reacciona a una concentración importante con las quinonas y los fenoles (102), provocando un incremento de estos y como consecuencia una necrosis rápida del tejido. Por esta razón, el éxito de estas técnicas ha sido limitado, ya que como se aplican *in vitro*, generalmente afectan las condiciones óptimas para el crecimiento de los explantes (95, 88).

EMPLEO DE MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN DE ESPECIES FRUTALES

Cultivo de embriones. La germinación *in vitro* es una técnica que consiste en la inducción del proceso de germinación en condiciones asépticas y controladas en cualquier época del año. Su utilización permite solucionar los problemas de estacionalidad de germinación de semillas, mejorar los rendimientos de semillas con dificultad para germinar en condiciones naturales (anulando la dormancia) y también se

utiliza con fines experimentales, para la obtención de plántulas con adecuadas condiciones fitosanitarias y disponibilidad de material vegetal para los trabajos de cultivo *in vitro* (8).

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 en la reducción del período de latencia de las semillas (103, 104), que en algunos casos se debe a inhibidores del desarrollo del embrión, presentes en el endospermo o en la cubierta de la semilla.

Se han realizado trabajos a partir de embriones cigóticos maduros de marañón, estableciéndose procedimientos que permiten la liberación y el aislamiento de los embriones, evadiéndose la dureza y resistencia del epicarpio, y la presencia de microorganismos superficiales (105), pero se ha evidenciado que solo se obtiene un desarrollo normal y sano del embrión cigótico, cuando se dejan intactos los cotiledones de las plántulas, pues los embriones cigóticos maduros axiales (sin cotiledones) no siempre dan lugar a la formación de una planta (106).

Embriogénesis somática. Es un método eficaz de regeneración de plantas leñosas (107, 108). En cítricos los callos embriogénicos constituyen una fuente valiosa, para la propagación o mejora genética, y también pueden ser utilizados para la hibridación somática a través de la fusión de protoplastos, transformación genética, producción de semillas sintéticas, eliminación de agentes patógenos y preservación de germoplasma *in vitro* artificiales (109).

En muchos sistemas experimentales, desarrollados para especies recalcitrantes, el establecimiento de un eficiente protocolo de embriogénesis somática se basa en el uso de material juvenil como fuente de explante (110, 111). Se ha señalado que el bajo número de plantas establecidas en campo a partir de cultivo embriogénico y la poca habilidad del tejido maduro para iniciar cultivos embriogénicos, son las mayores limitaciones de la embriogénesis somática en especies leñosas (112).

En marañón, numerosos estudios están dirigidos al desarrollo de un sistema de regeneración *in vitro* de plántulas mediante la inducción de embriogénesis somática, a partir de embriones cigóticos inmaduros (106), pues aunque se sabe que la embriogénesis somática en especies leñosas no está limitada al uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes, estos han mostrado un alto potencial para este tipo de morfogénesis (113, 114).

En cacao (*Theobroma cacao* L.) se logró establecer un protocolo de embriogénesis somática, utilizando como explantes estaminodes y pétalos florales; este incluye tres pasos y permite aumentar la tasa de multiplicación de este cultivo. Estos pasos incluyen la embriogénesis secundaria (115), micropropagación (116) y aclimatización (117).

Aunque en la mayoría de las referencias bibliográficas sobre embriogénesis somática de especies leñosas como el aguacate, mango y cacao, no se ofrece mucha información sobre la germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos, se conoce que la frecuencia de conversión de embriones a plantas es generalmente muy baja (118, 119). Los problemas de conversión son atribuidos, en muchos casos, a morfologías atípicas o a la inmadurez de los embriones somáticos formados (120).

La fase de maduración es el período en el desarrollo del embrión somático, en el cual ocurre la expansión de la célula somática y acumulación de sustancias de reservas (121). La correcta acumulación de reservas y el correspondiente incremento en el peso seco de los embriones somáticos pueden constituir indicadores de una alta calidad en el vigor, lo cual influye positivamente en su posterior germinación (122).

Numerosos trabajos están orientados a evitar la germinación precoz y a conseguir un aumento de la acumulación de sustancias de reserva en el embrión somático. La adición de concentraciones de ácido abscísico (ABA) durante la etapa de maduración promueve la acumulación de sustancias de reserva. El cambio en los niveles de ABA durante el desarrollo embrionario es bien conocido en semillas ortodoxas (123, 124), aunque en semillas recalcitrantes, se piensa que la fase de maduración no está influida por el ABA, de la misma forma que en embriones de especies con semillas ortodoxas (125), por lo que, en general, es difícil controlar en condiciones *in vitro* el desarrollo de este tipo de embrión. De aquí la necesidad de realizar nuevos estudios y experimentación, como pasos fundamentales a la hora de proponer un medio de maduración para estos embriones somáticos.

El desarrollo pobre de los cotiledones puede ser el factor principal que afecte a la maduración y posterior conversión de embriones somáticos en plantas, por lo que el correcto crecimiento y desarrollo completo de los cotiledones de embriones somáticos, sin dudas ayudaría a mejorar la maduración y las tasas de conversión de embriones somáticos (106).

Para aquellos cultivares que son recalcitrantes a la formación de embriones somáticos, se recomienda ensayar nuevas estrategias, para inducir la formación de estas estructuras, y, en caso de insistir en la producción masiva de plantas, es preferible aplicar formas alternativas de micropropagación, tales como el cultivo de yemas apicales y laterales o microinjertos (126).

CONCLUSIONES

- Los métodos convencionales de propagación de frutales leñosos son difíciles de aplicar y solo se obtienen resultados a muy largo plazo.
- La germinación de semillas de especies frutales en condiciones *in vitro* permite obtener material vegetal con adecuado estado fitosanitario, tanto con fines experimentales como para trabajos de cultivo *in vitro*.
- La embriogénesis somática constituye un método eficaz para la regeneración de frutales leñosos, con énfasis en los cultivares recalcitrantes.
- La contaminación microbiana y oxidación fenólica constituyen uno de los problemas más graves en la micropropagación de frutales a nivel mundial.
- Los métodos de detección de vitropatógenos son herramientas importantes en la planificación de cultivos *in vitro* y para combatir enfermedades de poblaciones de frutales.
- Los sistemas de propagación de frutales leñosos con el empleo de la biotecnología, podrían revertir los problemas que existen en la propagación por métodos convencionales a corto plazo, pero su éxito depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana y oxidación fenólica.

REFERENCIAS

1. FAO. Colección FAO. Estadísticas. Organización para la Agricultura y la Alimentación. 1996, 1862 p.
2. Hartman, H. y Kester, D. Propagación de Plantas. México: Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., 1998, 760 p.
3. Esaú, H. Anatomía. España: 3^{era} edic. Edit. Omega, 1985, 114 p.
4. Vázquez, C.; Orozco, A.; Roja, M.; Sánchez, M. y Cervantes, V. La reproducción de las plantas semillas y meristemas. 1998. <http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm>.

5. Vázquez, Y. y Orozco-Segovia A. Fisiología ecológica de las semillas de árboles de la selva tropical. Un reflejo de su ambiente. *Ciencia (AIC)*, 1984, no. 35, p. 191-201.
6. Hartmann, H. T.; Kester, D. E. y Davis, F. T. Propagación de plantas. México: 4ta edic. Edit. Continental, 1990, 199 p.
7. Bapat, V.A. y Matatre, M. Bioencapsulation of somatic embryos in woody plants. En: Jain, S. M. y Gupta, P. K. Protocol for Somatic Embriogenesis in woody plant, 2005, 539-552 p.
8. Encina, C. L.; Padilla, I. M.; Cazorla, J. M.; Mercado, V. I. y Caro, E. Mejora Biotecnológica del Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). *Fruticultura*, 2002, vol. 21, no. 241, p. 25-28.
9. Agramonte, D.; Delgado, L; Trocones, A.; Pérez, M.; Ramírez, D; Gutiérrez, O. Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill. ex. Maiden) a partir de segmentos nodales. *Biotecnología Vegetal*, 2001, vol. 1, no. 2, p.109-114.
10. Jiménez, E. Cultivo de ápices y meristemos, 1998. En: Pérez, P. JN. Ed. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas. 45-56p.
11. Ellis, R. H.; Hong, T. D. y Roberts, E. H. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Vol. I. Principles and Methodology. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, 1985, Roma, Italia.
12. Baskin, C. C. y Baskin, J. M. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. California: Academic Press, San Diego, 2001. 666 p.
13. Nikolaeva, M. G. Physiology of deep dormancy in seeds Izdatel'svo "Nauka" Leningrad. National Science Foundation, Washington D.C., 1969.
14. Baskin, J. M. y Baskin, C. C. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Re.*, 2004, no. 14, p. 1-16.
15. Finch, W. E. y Leubner, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 2006, no. 171, p. 501-523.
16. Scheldeman, X. Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. Ph.D. thesis Universiteit Gent, Bélgica. 2002. 176 p.
17. Da Silva, E. A.; De Melo, D. L.; Davide, A. C.; De Bode, N.; Abreu, G. B.; Faria, J. M. y Hilhorst, H. W. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Ann. Bot.*, 2007, no. 99, p. 823-830.
18. Hayat, M. A. y Canright, J. E. The developmental anatomy of Annonaceae. I. Embryo and Early Seedling. *Amer. Bo.*, 1965, vol. 53, no. 3, p. 228-237.
19. Gentil, D. F. Conservação de sementes do cafeeiro: resultados discordantes ou complementares? *Bragantia*, 2001, vol. 60, no. 3, p. 149-154.
20. Martínez, M. A. Fisiología de la maduración de los frutos de mamey. [Tesis de Maestría]. Montesillo, México, 1998, 70 p.
21. Willam, R. L. Guía para la manipulación de semillas forestales, estudio con especial referencia a los trópicos. FAO Montes, 1991, 502 p.
22. Roth, I. y LindFord, H. Desarrollo y Anatomía del fruto de la semilla de *Achras Sapota* L. (níspero). *Acta Botánica Venezuelica*, 1972, 52 p.
23. Granados, L. C. Algunas selecciones nuevas de zapote (*Pouteria sapota*) en Guatemala. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.*, 1995, no. 39, p.115-118.
24. Almeyda, N. y Martin, F. Cultivation of neglected tropical fruits with promise. Part I. 1976, 483 p.

25. Duarte, O.; Nieto, M. y Suárez, A. Tratamientos para mejorar la germinación y el enraizamiento de estacas de marañón (*Anacardium occidentale* L.). *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, 1999, no. 35, p. 9-14.
26. Torres, R. El níspero. Fondo de Desarrollo Frutícola. Venezuela. *Revista La Fruta*, 1974, no. 24, p. 4-5.
27. Aguilera, N. Apuntes para libro: Frutales tropicales arbóreos amenazados en Cuba, 2005.
28. Daquinta, M.; Cid, M.; Lezcano, Y.; Pina, D.; Rodríguez, R. y Escalona, M. Recuperación de especies forestales y bambúes por métodos biotecnológicos. Forum de Ciencia y Técnica, Ciudad de La Habana, 2004, 40p.
29. Debergh, P. y Zimmerman, R. Micropropagation Technology and Application. Ed. Kluwer Academic Publishers. 1991, 484 p.
30. George, E. F. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1. 2nd. Ed., Exegetics Ltd, 1993, 130-143 p.
31. Leifert, C.; Morris, C. E. y Waites, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1994, vol. 13, p. 139-183.
32. Leifert, C., Waites, W. M.; Camotta, H. y Nicholas, J. R. *Lactobacillus plantarum*; a deleterious contaminant of plant tissue. *J. App. Bacteriology*, 1989, vol. 67, p. 363- 370.
33. Herman, E. B. Toward control of micropropagation contamination. *Agricell Report*, 1987, vol. 9, p.33-35.
34. Long, R. D.; Curtin, T. F. y Cassells, A. C. An investigation of the effect of bacterial contaminants on potato nodal cultures. *Acta Hort.*, 1988, vol. 225, 83-91 p.
35. Leifert, C.; Waites, W. y Nicolas, J. R. Contaminants of plant in tissue and cell cultures. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1991, vol. 7, p. 452-469.
36. Long, R. D. Photoautrophic micropropagation a strategy for contamination control. En: Cassells, AC y Hayes B (Eds.), Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria Contaminants of Plants Tissue Cultures, University College, Cork, 1997, 21 p.
37. Pérez, J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 1998. 390 p.
38. Madoff, S. The L-forms of bacteria. En: Starr, M.; Stolp, H.; Traper, H.; Balows, A. y Schlegel, H. (Eds). The prokaryotes, vol. II Springer-Verlag, A. Berlin. 1981, 2225-2237p.
39. Cassells, A. Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. *Acta Hort*, 1988, vol. 225.
40. Debergh, P. y Zimmerman, R. Micropropagation Technology and Application. Ed. Kluwer Academic Publishers. 1991, 484 p.
41. Roca, W. y Mrogrinski, L. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 1993, 969p.
42. Pype, J.; Everaert, K.; Debergh, P. Contamination by micro-artropods in tissue cultures. En: Casell, A. C. y Hayes, B. (Eds.). Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria Contaminants of Plants Tissue Cultures, University College, Cork. 1996, 21p.
43. Alvarado, Y.; García, L.; Martínez, Y.; Ramírez, D.; Pichardo, T. y Portal, N. Estudio de la influencia de la contaminación bacteriana en la micropropagación

- de caña de azúcar var. Cuba. Libro de reportes cortos Biotecnología Vegetal. 1999. 87-51p.
44. Döbereiner, J.; Reis, V.; Paula, M. y Olivares, F. Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants. International Congress of Nitrogen Fixation. Cancún. México. 1992.
 45. Bellone, C.; Carrizo, S. y Pedraza R. Colonization of sugarcane roots by *Acetobacter diazotrophicus* and vesicular arbuscular mycorrhizae. 1995.
 46. Carrizo, S. Microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a partes aéreas de la caña de azúcar en la provincia de Tucumán. 2000. 173p.
 47. Leifert, C.; Waites, W.; y Nicolas, J. R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, vol. 67, p. 353-361.
 48. Barrett, C. y Cassells, A. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelagonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. Grand Slam explants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, vol. 36, p. 169-175.
 49. Alvarado, Y. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: J. N. Pérez, (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 1998. 81-104 p.
 50. Ramírez, M.; Isea, F.; Santos, R.; León de Sierralta, S.; Urdaneta, A. Hongos contaminantes en el cultivo *in vitro* de ápices de plantas adultas de *Annona muricata* tratados con Hipoclorito de Sodio, en el estado Zulia, Venezuela. En: Acosta, M (eds.) Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 2005, vol. 75, p. 60-63.
 51. Acosta, M.; Alvarado, Y.; Caballero, I. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotecnología Vegetal*, 2002, vol. 2, no. 2, p. 67-71.
 52. Borges, L., Morales, H.; Valero, Z.; León, S.; Santos, R.; Castro, C. y Del Villar, A. Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. VII Jornadas Científico Técnicas. Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 1997, 102 p.
 53. Isea, F.; Escalante, M.; Urdaneta, J. y Ramírez, M. Presencia de hongos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango (*Mangifera indica* L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 2004, vol. 21 no. 1, p. 193-199.
 54. Leifert, C. y Cassells, A. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2001, vol. 37, p. 133-138.
 55. Ramírez, M.; Santos, R. e Isea, F. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 2000, vol. 17, p. 217-225.
 56. Niedz, R. P. y Bausher, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and fields grown trees. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2002, vol. 38, p. 468-471.
 57. Leifert, C. y Woodward, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 52, p. 83-88.

58. Parkinson, M.; Predergast, M. y Sayegh, A. J. Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. *Plant Growth Regulation*, 1996, vol. 20, p. 61- 66.
59. Jiménez, E. Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara. Cuba. 1998. 45–56p.
60. Ramírez, M.; Salazar, E. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1997, vol. 14, p. 497-506.
61. Acosta, M.; Alvarado, Y.; Cruz, M.; Leiva, M. y Delgado, L. Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis* *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 2005, vol. 75, p. 60-63.
62. Cruz, M.; Acosta, M.; Leiva, M.; Alvarado, Y.; Lezcano, M. Evaluación del efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos. Contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. *Biotecnología Vegetal*, 2002, vol. 2, no. 2, p. 73-76.
63. Surga, J. G. y Guevara, Y. Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banano (*Musa AAA*). *Fitopatología Venez.*, 1994, vol. 7, no. 1, p. 14-17.
64. Rivero, G.; Ramírez, M.; León, S. Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.), *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 2001, vol. 18, p. 258-265.
65. Dodds, J. H. Tissue culture of trees. AUI. Publishing. West port. Connecticut (EE.UU.). 1983.
66. Martínez, S. Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo *in vitro* e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa sp*). *Centro Agrícola*, 1995, vol. 19, no. 2-3, p. 93-96.
67. Benerjee, N.; Vuylsteke, D. y De Langhe, E. Meristem. T. P. Culture of Musa. Histo-morphological studies of shoot bud proliferation. En: Withers, L. A. y Alderson P. G. (Eds.): *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butter worth's. London. 1985, 139-147p.
68. Novat, F. J.; AFZA, R.; Van Durein, M. Mutagenesis *in vitro* para el mejoramiento del banano y el plátano (*Musa sp*). Informe mensual UPEB. Panamá City. 1988, 36p.
69. Fontúrbel, F. Los vitropatógenos: consideraciones generales, detección y eliminación. *El portal de Biología y Ciencias de la Salud*, 2001, vol. 6, p. 1-11.
70. De Fossard, R. A. y De Fossard, H. Coping with microbial contaminants and other matter in small commercial micropropagation laboratory. *Acta Horti.* 1988, vol. 225, p. 167-176.
71. Knauss, J. F. A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv. Prefection free of fungi and bacterial. *Proc. Fla. State Hort. Soc*, 1976, vol. 89, p. 293-296.
72. Boxus, P. H. y Terzi, J. M. Control of accidental contamination during mass propagation. *Acta Horticulturae*, 1988, vol. 225, p.189-193.
73. Norman, D. J. y Alvarez, A. M. Latent infections of *in vitro* *Anthurium* caused by *Xanthomonas campestris* pv *dieffenbachiae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1994, vol. 39, p. 55-61.
74. Tanprasert, P. y Reed, B. Determination of minimal bactericidal and effective antibiotic treatment concentrations for bacterial contaminants from micropropagated strawberries. *In vitro Cell and Developmental Biol. Plant.*, 1997, vol. 33, no. 3, p. 227-230.

75. Falkiner, F. Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation what are we aiming at?. En: Cassells, A. C. (Ed.) Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1990, 155-160 p.
76. Marcano, D. y Pire, A. Evaluación de diferentes desinfectantes y funguicidas en el control de sarna común *Streptomyces scabies* en semilla prebásica de para *Solanum tuberosum* L. *Agronomía Tropical*, 1993, vol. 43, no. 5-6, p. 203-215.
77. Meyer, H.; Staden, V.; Allen, S. y Van Staden, J. The use of antibiotics to control systemic bacteria *in vitro* cultures of *Piper nigrum* cv. Kuching. *South African Journal of Botany*, 1992, vol. 58, no. 6, p. 500-504.
78. Hussain, S.; Lane, S. y Price, D. A preliminary evaluation of the use of culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1994, vol. 36, p. 45-50.
79. Acosta, M.; Alvarado, Y.; Flores, A. Contaminantes fúngicos en la micropropagación de plantas con el uso de la esterilización química de los medios de cultivo. Libro de reportes cortos "Biotecnología Vegetal". V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, 1999, 239-240 p.
80. Kubota, C. y Tadokoro, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell and Developmental Biol. Plant*, 1999, vol. 35, no. 4, p. 296-298.
81. Ortega, E. Fisiología del estrés. Curso de posgrado, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2008.
82. Dalal, M. A.; Sharma, B. B. y Srinivasa, M. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. *Scientia Hort*, 1992, vol. 51, p. 35-41.
83. Marks, T. R. y Simpson, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hort. Sci.*, 1990, vol. 65, no. 2, p. 103-111.
84. Yu, D. y Meredith, C. P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1986, vol. 11, no. 6, p. 972-975.
85. Read, P. y Economou, A. Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Hort.*, 1987, vol. 212, p. 111.
86. Marks, T. y Simpson, S. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *J. of Hort. Sci.*, 1990, vol. 65, p. 103-111.
87. Albornoz, L.; Fernández, L.; León, S. y Castro, C. Efecto del tratamiento de plantas donantes y del número de explantes a utilizar para el control de la contaminación y ennegrecimiento en el cultivo *in vitro* de *Annona muricata* L. Memorias VI Jornadas Científicas Técnicas de la Facultad de Agronomía (LUZ). Maracaibo, Venezuela, 1993, 23 p.
88. León, S.; Arenas, L.; Vilorio, Z. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 1997, vol. 14, p. 43-55.
89. Read, P. y Economou, A. Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Hort*, 1987, vol. 212, p. 111.
90. Sharma, H. C.; Sharma, R. R. y Goswami, A. M. Effect of etiolation on polyphenoxidase activity in shoots of grape and its subsequent *in vitro* survival. *Indian J. Hor.*, 1995, vol. 52, p. 104-107.

91. Fanizza, G.; Tanzarella, O. A. y Carozo, G. Influence of *Vitis* source on *in vitro* shoot apex culture. *Ann. Applied Biol.*, 1984, vol. 104, p. 577-578.
92. Ramírez, M. Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.). Trabajo de Grado. Maracaibo. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. Programa Fruticultura. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, 1998, 132 p.
93. Muhitch, M. J y Fleycher, J. Influence of culture age and spermidine-treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. *Plant Physiol*, 1985, vol. 78, p. 25-28.
94. Hildebrandt, V. y Harney, P. M. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey Sprinter Scarlet. *J. Hort. Sci.*, 1988, vol. 63, p. 651-657.
95. Murashige, T. Plant Propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 1974, vol. 25, p. 135-166.
96. Claudebon, M.; Gendraud, M. y Francllet, A. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: Influence of Activated Charcoal. *Scientia Hort.*, 1988, vol. 34, p. 283-291.
97. Broome, O. C. y Zimmerman, R. H. *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience*, 1978, vol. 13, p. 151-153.
98. Vieitez, A. M. y Vieitez, E. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, vol. 1980, 50, p. 127-130.
99. Meyer, M. M. A new method for propagating woody plants from tissue culture. *The Azalea*, 1984, vol. 6, p. 13-15.
100. George, F. y Sherrington, P. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Basingtokes, England, 1984, 109p.
101. Sánchez-Cueva, M y Salaverría, J. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de la fresa. *Rev. UDO Agrícola*, 2004, vol. 4, no. 1, p. 21-26.
102. Hansberg, W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. En: Bonilla, C (Eds.) Mensaje Bioquímico, vol. XXVI. Universidad Nacional Autónoma de México, 2002, ISSN 0188-137.
103. Collins, G. B. y Grosser, J. W. Culture of embryos. En: Vasil, I. K. (Ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants. New York: Academic Press, 1984, vol.1, 241-257p.
104. Hu, C. Y.; Ferreira, A. G. Cultura de embriões. En: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998, vol. 1, p. 371-393.
105. 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.
106. Nadgouda R. S. y Gogate, S. S. Cashew (*Anacardium occidentale* L.). En: Jain, S. M. y Gupta, P. K. Protocol for Somatic Embryogenesis in woody plant, 2005, 157-165 p.
107. Mauro, M. C.; Nef, C. y Fallot, J. Simulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabarnet-Saugvignon. *Plant Cell Reports*, 1986, vol. 5, p. 377-380.
108. Perrin, M.; Martin, D.; Joly, D.; Demangeat, G. y Masson, J. E. Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cell. *Plant Science*, 2001, vol. 161, p. 107-116.

109. Grosser, J. W.; Ollitrault, P. y Fuster, O. Somatic hibrydization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In vitro Cellular and Development Biol. Plan.*, 2000, vol. 36, no. 6, p. 434-449.
110. Carman, J. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, vol, 1990, 26, p.746-753.
111. Karunaratne, S.; Gamage, C y Kovoor, A. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. *J. Plant Physiol*, 1991, vol. 139, p. 27-31.
112. 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.
113. Williams, E. y Maheswaran, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 1986, vol. 57, p. 443-462.
114. Canhoto, J. y Cruz, G. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma*, 1996, vol. 191, p. 34-45.
115. Maximova, S.; Alemanno, L.; Young, A.; Ferriere, N.; Traore, A. y Gultinan, M. G. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In vitro cell. Dev. Biol- Plant*, 2002, vol. 38, p. 252-259.
116. Traore, A.; Maximova, S. y Gultinan, M. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants. *In vitro cell. Dev. Biol. Plant*, 2003, vol. 39, p. 332-337.
117. Gultinan, M.; Miller, C.; Traore, A. y Maximova, S. Greenhouse and field evaluation of orthotopic cacao plants produced via somatic embryogenesis, micro and macropropagation: 13th International Cacao Research Conference, 2000.
118. Perán, R.; Sánchez, C.; Márquez, B.; Barceló, A.; Pliegoalfaro, F. Efecto del medio de cultivo sobre la maduración y germinación de embriones somáticos de aguacate. *Actas de Horticultura*, 2001, vol. 28. no. 1, p. 111-115.
119. Sarfraz, S.; Huenain, T. y Riazuddin, S. Somatic embryo germination and plant development from immature zygotic embryos in cotton. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2004, vol. 7, no. 11, p. 1946-1949.
120. Ammirato, P. V. Organizational events during somatic embryogenesis. En: Green, C. E. *et al.* (Eds). Alan R. Liss. Inc. Plant Tissue and Organ Culture, 1987, 57-81 p.
121. Bewley, J. D. y Black, M. Seeds–Physiology of development and germination. Plenum Press, Nueva York, 1985, 445 p.
122. Fuji, J.; Slade, D.; Olsen, R.; Ruzin, S. y Redenbaugh, K. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci.*, 1990, vol. 72, p 93.
123. Walker-Simmons, M. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.*, 1987, vol. 84, p. 61-66.
124. Hetherington, A. M.; Quatrano, R. S. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist*, 1991, vol. 119, p. 9-32.
125. Perán-Quesada, R. Embriogénesis *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.). [Tesis doctoral]. Universidad de Málaga, España, 2001.
126. Suárez, I. E.; Litz, R. E. y Jaraba, J. D. Embriogénesis somática en tres cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.). *Temas Agrarios*, 2004, vol. 9, no. 2, p. 32-41.