

ORGANOGENESIS INDIRECTA EN *MEDICAGO SATIVA* L. VAR. GILBOA

Maribel Regla Quintana Sanz, José Ángel Nápoles Gómez y Yaldreisy Tania Galdo Rodríguez

RESUMEN

La alfalfa se considera dentro de las plantas forrajeras más destacadas de la ganadería en muchos países. Su introducción en Cuba comenzó a estudiarse hace alrededor de 40 años, pero la no disponibilidad de semillas y de variedades adaptadas a las condiciones del clima, han sido factores que limitan su explotación. La biotecnología ofrece técnicas que pueden lograr variedades con tolerancia a factores de estrés, adaptadas a nuestras condiciones climáticas, lo cual necesariamente tiene que comenzar creando la base cognoscitiva del cultivo de tejidos de la planta que permita su manipulación *in vitro*. Una de las técnicas que pueden facilitar dicha proyección es el desarrollo de un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta. El objetivo de este trabajo se centró en lograr la formación de brotes a partir de callos en *Medicago sativa* L. var. Gilboa. En la formación de callos se determinó el efecto del tipo de explante con tres dosis (1, 3, 5 mg.L⁻¹) de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y un tratamiento control. Para la proliferación y regeneración de callo se evaluaron tres concentraciones de 2,4-D (2, 3 y 4 mg.L⁻¹) con 6-BAP (2, 3 y 4 mg.L⁻¹) y como control el medio MS. Al inducir los callos en la especie probada los segmentos de folíolos inmaduros tomados a partir de hojas de vitroplantas cultivadas *in vitro* mostraron los índices más elevados. Se pudo comprobar que la multiplicación de células indiferenciadas necesita de la presencia auxínica para un mejor crecimiento de la masa celular, los resultados superiores en la formación de callo (85 %) se obtuvieron con la dosis media de 2,4-D (3 mg.L⁻¹). La proliferación de callo fue eficiente, pero la formación de brotes sólo fue superior estadísticamente en el medio que combinó 6-BAP (4 mg.L⁻¹) y 2,4-D (2 mg.L⁻¹).

Palabras clave: Leguminosa forrajera, explante, callos, regeneración.

Indirect organogenesis in *Medicago sativa* L. var. Gilboa**ABSTRACT**

The alfalfa is considered one of the most important forage plants in livestock feeding all over the world. The introduction in Cuba began about 40 years ago, but difficulties of seed reproductions and varieties well adapted to climate conditions have been the main factors to limit its exploitation. Plant biotechnology offers many techniques that can achieve new varieties with stress tolerance, and adapted to our climate conditions, but all of these have to begin creating the cognitive bases of tissue culture to permit the *in vitro* plant manipulation. This projection can be developed using an *in vitro* regeneration via organogenesis protocol. The objective of this work was to obtain shoots formation from morphogenetic callus in *Medicago sativa* L. var. Gilboa. Different explants were studied for callus formation using three doses (1, 3, 5 mg.L⁻¹) of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and a control treatment. Three concentration of 2,4- (2, 3 y 4 mg.L⁻¹) combined with 6-benzylaminopurine (2, 3 y 4 mg.L⁻¹) and a MS medium as control treatment were evaluated to achieve proliferation and regeneration of callus. The highest percentage of callus induction was observed for immature leaf explants. Auxin presence was a necessary requirement for a better growth

Ing. Maribel Regla Quintana Sanz, Master en Ciencias en Biotecnología Vegetal, Investigadora Auxiliar, Profesora Auxiliar. Dpto. Biotecnología Vegetal. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spíritus. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. Carretera Central km 395. Sancti Spíritus, Cuba. Email: pastossp@enet.cu

of cellular mass during callus multiplication. Highest percentage of callus formation (85 %) was observed with 3 mg.L⁻¹ of 2,4-D. Callus proliferation was efficient, but shoot formation was only superior statistically when 6-BAP (4 mg.L⁻¹) and 2,4-D (2 mg.L⁻¹) were combined into the culture medium.

Key words: Forage legume, explant, callus, regeneration.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las pasturas duplican en área a las tierras con cultivos de cosecha. Proveen alimento a la fauna silvestre y tienen un rol destacado en la conservación de los suelos y la protección ambiental. Son a menudo cultivadas en tierras menos aptas para cultivos de cosecha. Su mejora genética y adaptación a los sistemas productivos pecuarios ha de tener un profundo impacto en el incremento de la producción de leche, carne y otros productos. El cultivo de tejidos puede aportar importantes beneficios a los programas de mejoramiento vegetal (Borém y Fritsche-Neto, 2014; Brown *et al.*, 2014).

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una de las plantas forrajeras más importantes del mundo con un rol trascendental en la alimentación animal (Orcen, 2013). Cuba requiere de cultivos forrajeros con un alto valor nutritivo acompañado de elevados rendimientos en la época poco lluviosa, para con ello poder lograr una mayor eficiencia en la explotación ganadera del país. Resultados de la provincia de Guantánamo pusieron de manifiesto que el cultivo de alfalfa puede ser altamente ventajoso para esta y otras condiciones similares, según Menéndez *et al.* (1987); pero la no disponibilidad de semillas, así como de nuevas variedades para adaptar a las condiciones del clima han sido factores que han limitado su explotación.

De este modo dirigir acciones a la adaptación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético puede ser una vía que complementa los métodos convencionales (Cobb *et al.* (2013), Heisey y Fuglie (2014), Srivastava *et al.*, 2014), para lograr una mayor productividad, sanidad y calidad de las leguminosas,

dentro del marco de una agricultura sustentable (Abdel Latef y Ahmad, 2015; Babar *et al.*, 2015).

El cultivo de tejidos en especies de *Medicago* fue iniciado por Brown y Atanassov (1985). Autores como Chen *et al.* (1987) y Zimmermann (1993) investigaron la inducción directa de embriogénesis somática. Sin embargo, aunque Bingham *et al.* (1975) y Mitten *et al.* (1984) reportaron una alta frecuencia de regeneración, estos resultados han sido poco frecuentes. La mayoría de estas técnicas en alfalfa se han caracterizado por una baja frecuencia en la capacidad de regeneración, posibilidad de variación somaclonal y una alta dependencia del genotipo evaluado. Así, la generalidad de los resultados logrados en el mejoramiento de la especie han sido por los métodos tradicionales (Volenc *et al.*, 2002), debido a la falta de protocolos de regeneración eficientes para un amplio rango de genotipos de alfalfa (Li *et al.*, 2009). En consecuencia, es necesario investigar la respuesta ante el cultivo de tejidos de diferentes cultivares para poder desarrollar protocolos que permitan una rápida y eficiente multiplicación de la especie, que satisfaga los requerimientos para estudios básicos de biología molecular y nuevas estrategias en el mejoramiento de la alfalfa (Orcen, 2013).

Una de las técnicas que pueden facilitar dicha proyección es el desarrollo de un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta. Es por ello que el objetivo de este trabajo se centró en evaluar la respuesta ante el cultivo de tejidos de la alfalfa (*Medicago sativa*, L.) variedad Gilboa, usando diferentes explantes y su habilidad para regenerar

ante diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus del Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, MINAG.

Como fuente de material inicial se utilizaron semillas de *Medicago sativa* var. Gilboa, suministradas por el Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes; las cuales fueron germinadas en condiciones estériles para la extracción de los diferentes explantes.

El medio basal para todos los experimentos fue el descrito por Murashige y Skoog (1962) exento de reguladores de crecimiento, que en lo adelante se denominará MS. En la gelificación del mismo se usó agar (Sigma Chemical Co.) a razón de 8 g.L⁻¹ y en todos los casos el pH se ajustó a 5,8 antes del autoclaveado. Se utilizaron como recipientes para el cultivo tubos de ensayo (15,5 x 2,0 cm) a los que se le añadió 10 mL de medio.

La fuente de iluminación empleada fue la luz natural en cámara de condiciones controladas, donde los explantes fueron sometidos a una intensidad luminosa de 2500 a 3500 lux y 11 horas luz/día. La temperatura osciló en un rango de 27 ± 2 °C.

El diseño empleado fue completamente aleatorizado y para el procesamiento de los datos se utilizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y las diferencias definidas por el test de Mann-Whitney. Todos los procesamientos se hicieron utilizando el paquete estadístico SPSS/PC versión 15,0.

Influencia del tipo de explante en la inducción del callo

Para determinar el efecto del tipo de explante en la formación de callos, se emplearon hipocótilos, cotiledones, segmentos de hojas primarias inmaduras, discos de hojas y yemas apicales; los cuales se extrajeron de las plántulas estériles procedentes de 15 días en cultivo.

Se probó la acción de la auxina 2,4-D en tres dosis (1, 3, 5 mg.L⁻¹) y como control el medio MS basal. A los 15 y 30 días se evaluó: contaminación (hongos y bacterias), por ciento de explantes que formaron callos y por ciento de callo formados por explante (0, 25, 50, 75 y 100 %).

Influencia del medio de cultivo en la proliferación de callo

Tomando como material de partida las plántulas estériles procedentes de semillas germinadas *in vitro* con 15 días de cultivo para extraer como explante segmentos de hojas primarias inmaduras, se procedió a su inoculación en medio de cultivo MS basal con los siguientes reguladores de crecimiento: 2,4-D (1, 3, 5 mg.L⁻¹) combinado con 6 - Bencilaminopurina (6-BAP) (0 y 1 mg.L⁻¹) y kinetina (KIN) (0 y 0,5 mg.L⁻¹) para un total de 16 tratamientos.

A los 15 y 30 días se evaluó: contaminación (hongos y bacterias), por ciento de explantes que formaron callos y por ciento de callo formados por explante (0, 25, 50, 75 y 100 %).

Inducción de regeneración vía callo

Callos compactos nodulares procedentes del mejor resultado del experimento anterior (2,4-D, 1 mg.L⁻¹; KIN, 0,5 mg.L⁻¹ y 6-BAP, 1 mg.L⁻¹), se multiplicaron durante dos subcultivos en el mismo medio y similares condiciones a las ya descritas. Posteriormente, los callos fueron transferidos a un medio de cultivo para la formación de brotes constituido por el MS basal adicionándole concentraciones de 2,4-D (2, 3 y 4 mg.L⁻¹) en

combinación con 6-BAP (2, 3 y 4 mg.L⁻¹) y se mantuvo como control el medio MS.

Se evaluó a los 20 días la presencia de puntos verdes, regeneración de brotes y el nivel de formación de callo nodular (Schumann *et al.*, 1995, citado por García *et al.*, 2010), la cual se describe a continuación:

- 1.-Explantado muerto.
- 2.-Explantado vivo sin formación de callo.
- 3.-Explantado vivo con pequeñas áreas de formación de callo nodular.
- 4.-Explantado con un 50 % de formación de callo nodular.
- 5.-Explantado con un 100 % de formación de callo nodular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del tipo de explante en la inducción del callo

Los resultados de este experimento demostraron que en el medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D es posible obtener callos a partir de los explantes probados en *Medicago sativa*, L. var. Gilboa. El mayor porcentaje de formación de callos se obtuvo con la dosis media de la auxina (3 mg.L⁻¹) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Tabla 1). Fue superior el porcentaje de callo formado a partir de los segmentos de hojas primarias inmaduras, difiriendo ($p \leq 0,05$) del resto de explantes evaluados.

Tabla 1. Formación de callo en diferentes tipos de explante en alfalfa var. Gilboa a los 28 días de cultivo.

2,4-D (mg.L ⁻¹)	Tipo de explante					\bar{x}
	Hipocótilos	Cotiledones	Hoja primarias inmaduras	Discos hojas	Yemas apicales	
1	61	70	80	69	72	70,4 ^b
3	82	83	90	86	84	85,0 ^a
5	59	50	72	62	65	61,6 ^b
\bar{x}	67,3 ^c	67,7 ^c	80,7 ^a	72,3 ^b	73,7 ^b	

Medias con letras no comunes difieren $p \leq 0,05$.

La influencia del medio de cultivo en la formación de callo ha sido descrita por Orcen (2013) para *Medicago sativa* L. var. Kayseri y reafirmada por Noaman y Ahmad (2004) quienes utilizan 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D al evaluar tolerancia a la salinidad en alfalfa mediante el empleo de la organogénesis. Por otra parte, Li *et al.* (2009) recomiendan 0,025 mg.L⁻¹ de thidiazuron (TDZ) con 3 mg.L⁻¹ de AgNO₃ en medio MS para una eficiente organogénesis probada en nueve genotipos de alfalfa.

Diferencias en el comportamiento morfológico de los callos a partir del uso de diferentes tipos de explantes ha sido expuesta por Collado *et al.* (2008) al solo observar brotes en los callos desarrollados a partir de cotiledones con segmentos de ejes embriogénicos en la organogénesis indirecta de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. No así, para diferentes cultivares de alfalfa donde se informan resultados positivos al emplear segmentos de hojas primarias (Orcen, 2013; Noaman y Ahmad, 2004) y nodos cotiledonares e hipocótilos para Li *et al.* (2009).

Influencia del medio de cultivo en la proliferación de callo

La proliferación de callos en el experimento fue alta (Figura 1) y se alcanzó un 100 % solo en los medios que combinaron los tres reguladores de crecimiento, observándose mayor incidencia de esta variable en la dosis media de la auxina (3 mg.L⁻¹). En los tratamientos que probaron la ausencia de 2,4-D en el medio de cultivo se verificó mínima o nula emergencia de tejido indiferenciado del segmento de foliolo en

cultivo con diferencias altamente significativas respecto al resto de los tratamientos, de donde se infiere la importancia de la presencia auxínica para la inducción de callos en esta especie, también expresado por Rodríguez *et al.* (2014). La incorporación del 6-BAP en el medio aumentó en todos los casos la formación de callos, no así en el caso de la KIN que sólo favorece el experimento cuando actúa sinérgicamente en combinación con las otras hormonas.

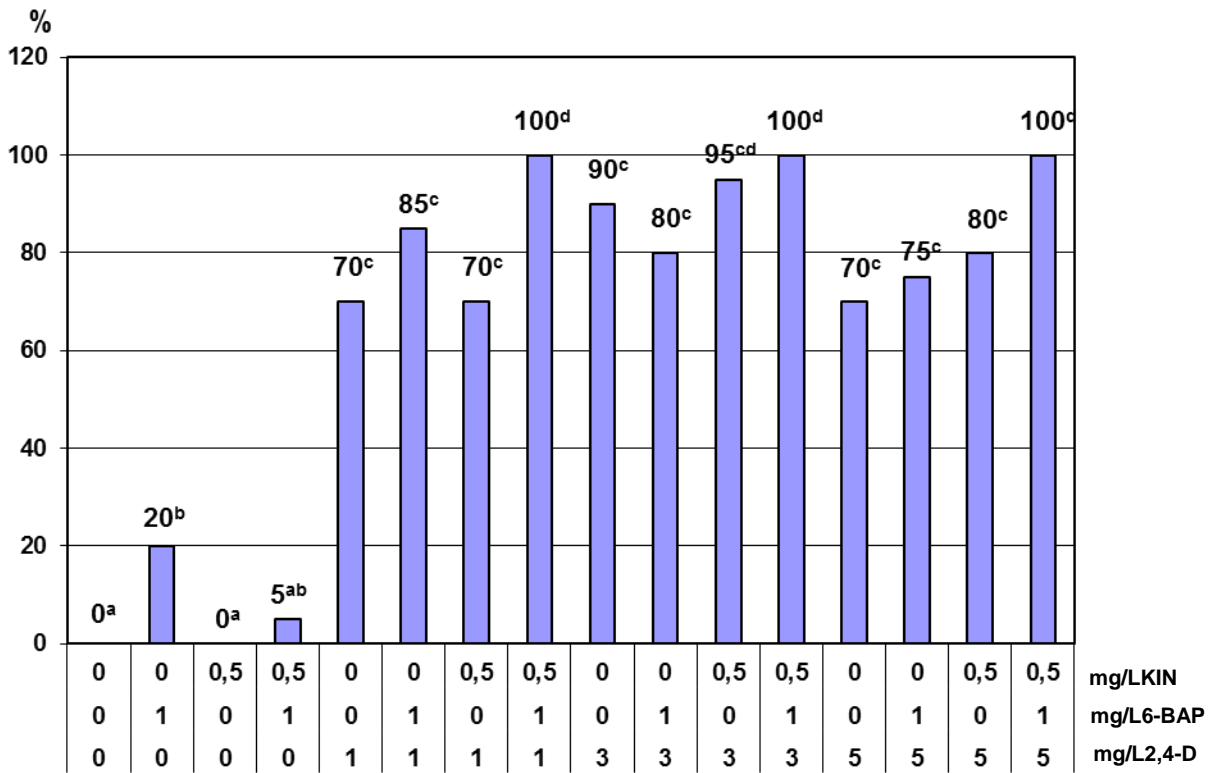


Figura 1. Porcentaje de explantes que forman callos en los medios evaluados. Letras distintas difieren estadísticamente para p≤0,001.

La Figura 2 muestra diferencias estadísticas en el porcentaje de callo formado en cada explante, coincidiendo la mejor emergencia de callo cuando se combinan auxina y citoquininas, siendo de preferencia la dosis más baja de 2,4-D con un 96 % de callo formado. Al probar el 6-BAP y la KIN actuando solas

o combinadas entre sí no llegan a expresar resultados satisfactorios en el experimento, por lo que se reafirma la necesidad auxínica para el logro de los objetivos de la presente investigación. Estos resultados coinciden con Quintana *et al.* (2014) y Rodríguez *et al.* (2014).

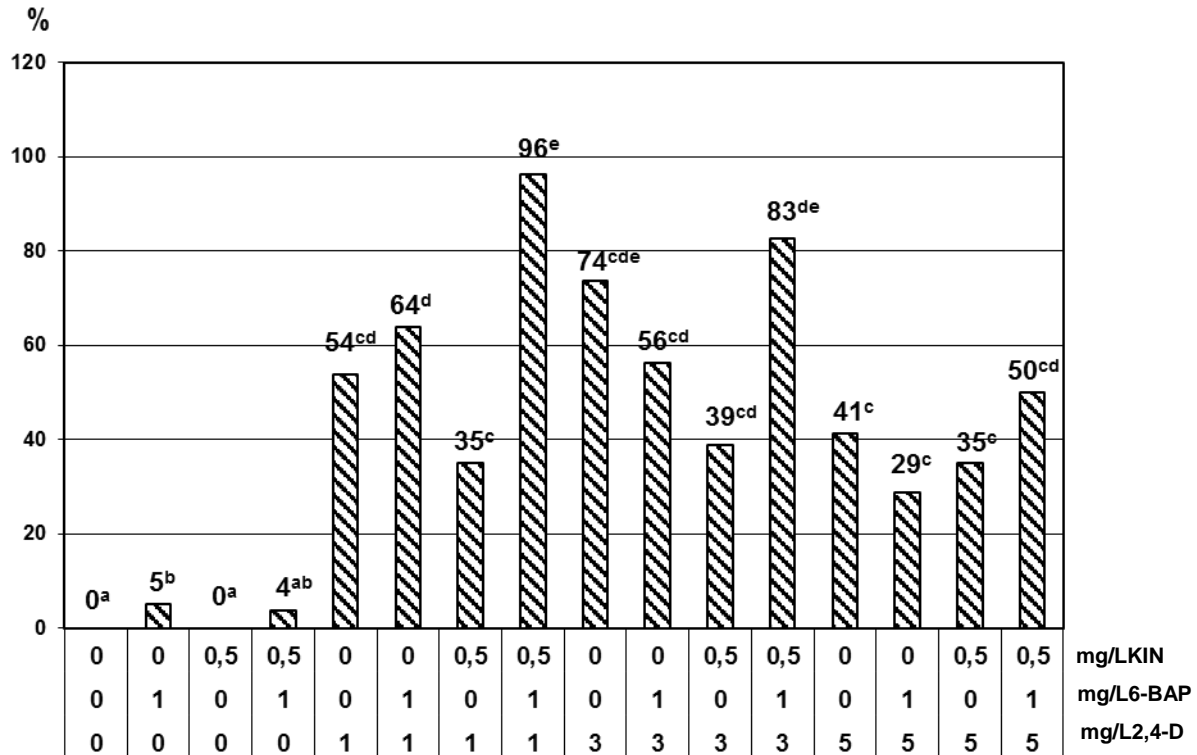


Figura 2. Porcentaje de callo formado por explante en los medios evaluados. Letras distintas difieren estadísticamente para $p \leq 0,001$.

Los callos obtenidos en todos los casos fueron de color blanco cremoso, con puntos verdes, opacos, de forma nodular y consistencia compacta. Al observarse al microscopio estereoscópico mostraron presencia de formaciones de masas celulares organogénicas en forma de brotes iniciales (Figura 4A). Algunos autores (Zare *et al.*, 2009) plantean que existe correlación entre la capacidad de regeneración de brotes y una buena formación de callos, por lo que puede considerarse el resultado de las Figuras 1 y 2 como positivo para la investigación.

Inducción de regeneración vía callo

Al transferir los callos nodulares procedentes de subcultivos al medio para inducir brotes se pudo observar (Figura 3) un comportamiento favorable ante

la dosis de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D similar a los resultados obtenidos por Noaman y Ahmad (2004), aunque para la variedad Gilboa se alcanzan los valores superiores al combinar la auxina con 4 mg.L⁻¹ de 6-BAP.

En la Tabla 2 se puede observar que todos los tratamientos probados formaron brotes a partir de callos a los 45 días de cultivo excepto para el control, los cuales no difirieron morfológicamente de un tratamiento a otro (Figura 4B). Aunque es de señalar que, en todos los casos al aumentar las concentraciones de la citoquinina, se incrementó el número de brotes formados, alcanzando su máximo valor para la combinación con la dosis inferior de 2,4-D (2 mg.L⁻¹), la cual difirió significativamente con el resto de los tratamientos evaluados.

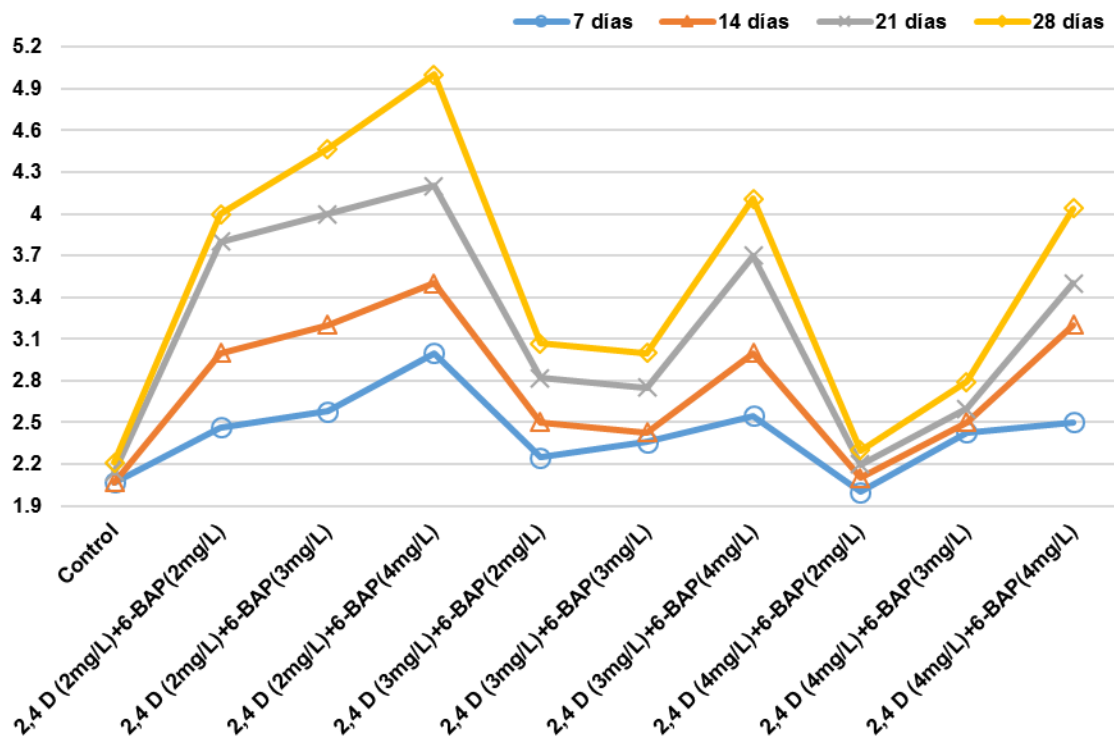


Figura 3. Crecimiento de los callos nodulares en medios de cultivo para la formación de brotes.

Tabla 2. Efecto de las diferentes concentraciones de 2,4-D y 6-BAP sobre la cantidad de brotes formados en *M. sativa* L. var. Gilboa a los 45 días de cultivo.

Tratamientos	No. de brotes por explante
Control	0
2,4-D (2 mg.L ⁻¹)+6-BAP (2 mg.L ⁻¹)	2,40 ^b
2,4-D (2 mg.L ⁻¹)+6-BAP (3 mg.L ⁻¹)	2,92 ^b
2,4-D (2 mg.L ⁻¹)+6-BAP (4 mg.L ⁻¹)	3,75 ^a
2,4-D (3 mg.L ⁻¹)+6-BAP (2 mg.L ⁻¹)	1,36 ^c
2,4-D (3 mg.L ⁻¹)+6-BAP (3 mg.L ⁻¹)	1,56 ^c
2,4-D (3 mg.L ⁻¹)+6-BAP (4 mg.L ⁻¹)	2,11 ^{bc}
2,4-D (4 mg.L ⁻¹)+6-BAP (2 mg.L ⁻¹)	1,02 ^d
2,4-D (4 mg.L ⁻¹)+6-BAP (3 mg.L ⁻¹)	1,09 ^{cd}
2,4-D (4 mg.L ⁻¹)+6-BAP (4 mg.L ⁻¹)	1,10 ^{cd}

Medias con letras no comunes difieren p ≤0,05.

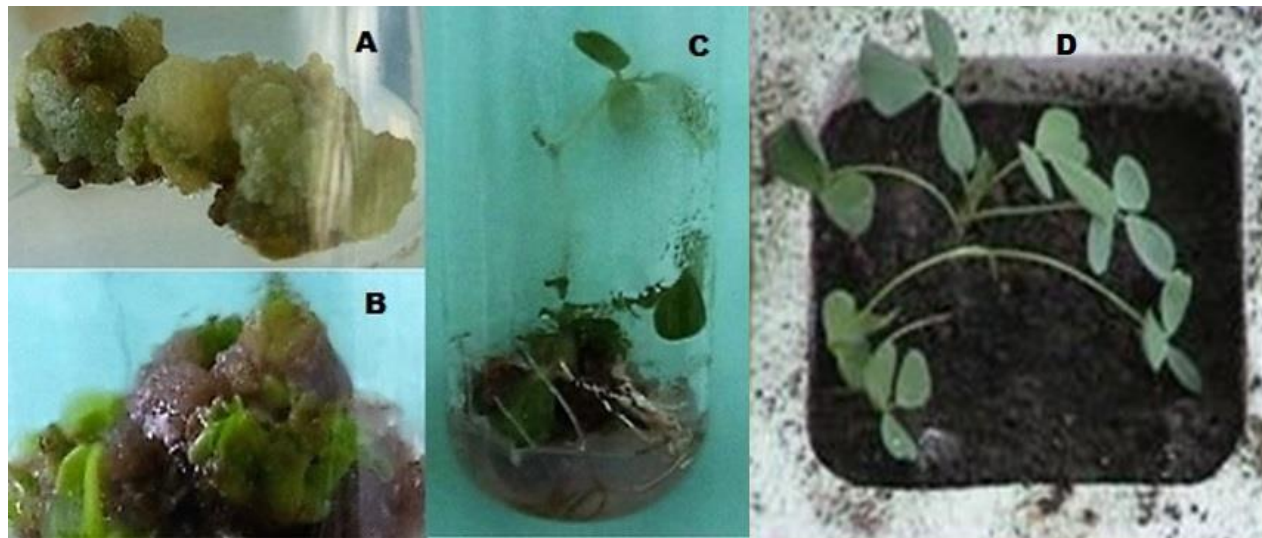


Figura 4. Regeneración de plantas en *M. sativa* var. Gilboa (A) Formación de callo a los 30 días a partir de segmentos de hojas primarias inmaduras en medio MS suplementado con 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ KIN (B) Formación de brotes a partir de callos a los 45 días en medio MS con 2 mg.L⁻¹ 2,4-D y 4 mg.L⁻¹ 6-BAP (C) Plántulas en medio MS sin reguladores de crecimiento a los 30 días (D) Plántulas en fase de adaptación a los 15 días de plantadas.

Collado *et al.* (2008) demostraron que la adición de 2 mg.L⁻¹ de 6-BAP incrementó en 2,2 el número de brotes obtenidos en 0,5 g de callo para *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Posteriormente al aplicar similar protocolo de trabajo García *et al.* (2012) evaluando la regeneración *in vitro* de cinco variedades de *P. vulgaris* L. constataron una eficiente multiplicación, aunque hubo una respuesta diferencial acorde a las variedades. De forma general el 6-BAP es una de las citoquininas más ampliamente usada para la formación de brotes *in vitro* (Akitha Devi *et al.*, 2012; Orcen, 2013), aunque la organogénesis *in vitro* ha de estudiarse como un proceso complejo de desarrollo celular bien coordinado, justo como ocurre *in vivo* (Zhang y Lemaux, 2004).

Al transferir los brotes obtenidos a un medio MS basal (Figura 4C), se verificó el crecimiento y elongación de las plántulas permitiendo su transferencia a condiciones semicontroladas

para su aclimatación (Figura 4D) y posterior plantación en suelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel Latef, A.A. y Ahmad, P. (2015): Chapter 1. Legumes and breeding under abiotic stress: an overview. En: Legumes under environmental stress yield. Improvement and adaptations. Azooz, M.M. and Ahmad, P. (Eds.) Oxford, UK. p. 2.
- Akitha Devi, M.; Sakthivelu, G.; Giridar, P. y Ravishankar (2012): Protocol for augmented shoot organogenesis in selected variety of soybean (*Glycine max* L. Merr.) Indian J. Exp. Biol., 50: 729-734.
- Babar, M.M.; Zaidi, N.S.; Azooz, M.M. and Kazi, A. G. (2015): Chapter 15. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. En: Legumes under environmental stress yield. Improvement and adaptations. Azooz,

- M.M. and Ahmad, P. (Eds.) Oxford, UK, p. 255.
- Bingham, E.T.; Hurley, L.V.; Kaatz, D.M. y Saunders, J.W. (1975): Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.*, 15: 719-721.
- Borém, A. y Fritsche-Neto, R. (2014): *Biotechnology and Plant Breeding Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. First edition. Oxford, UK., 8-9.
- Brown, D.C.W. y Atanassov, A. (1985): Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 4: 111-122.
- Brown, J.; Caligari, P.D.S. y Campos, H.A. (2014) *Plant breeding*. 2nd edition. Oxford, UK., 185-188.
- Chen, T.; Marowitch, J. y Thompson, B. (1987): Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 8: 73-81.
- Cobb, J.N.; DeClerck, G.; Greenberg, A.; Clark, R.; McCouch, S. (2013): Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theoretical Applied Genetics*, 126: 867-887.
- Collado, R.; García, L.; Angenon, G.; Torres, D.; Romero, C.; Bermúdez, I.; Veitía, N. y Ramírez, M. (2008): Organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. *Biología Vegetal*, 8(2): 81-86.
- García, L.; Bermúdez, I.; Veitía, N.; Collado, R.; Torres, D.; Romero, C. y Martirena, A. (2012): Regeneración de plantas de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. vía organogénesis directa. *Biología Vegetal*, 12 (1): 49-52.
- García, L.; Pérez, J.; Kosky, R.G.; Bermúdez-Caraballoso, I.; Veitía, N.; Collado, R.; Padrón, Y.; Torres, D.; Romero, C. y Reyes, M. (2010): Regeneración de plantas vía embriogénesis somática en *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Biología Vegetal*, 10 (3): 143-149.
- Heisey, P.W. y Fuglie, K.O. (2014): Private research and development for crop genetic improvement. En: *Genetically engineered crops in America analyses, adoption, trends*. F.G. Lawrence (Ed.), Nova Science Publishers, Inc. New York, EEUU. p. 130.
- Li, J.J.; Wu, Y.M.; Wang, T. y Liu, J.X. (2009): *In vitro* direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa*. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 325-328.
- Menéndez, J.; Tang, M. y Aira, A. (1987): Comportamiento de cultivares de alfalfa (*Medicago sativa*, L.) en Guantánamo. *Pastos y Forrajes*, 10 (3): 203-211.
- Mitten, D.H.; Sato, S.J. y Skokut, T.A. (1984): *In vitro* regeneration potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Sci*, 24: 943-945.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- Noaman, M.M. y Ahmad, E. (2004): Development of Alfalfa Tolerant to Salinity Stress Using Organogenesis Technique. *Biotechnology*, 3: 136-139.
- Orcen, N. (2013): *In vitro* organogenesis and regeneration of alfalfa (*Medicago sativa* L.) domestic cultivar cv. Kayseri. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22 (9a): 2770- 2774.
- Quintana, M.; Carbonell, A. y Nápoles, J.A. (2014): Capítulo III. Algunas técnicas biotecnológicas aplicadas al estudio de las leguminosas. En: *Leguminosas en la producción agropecuaria*. ACPA (Ed.), Cuba, 34-52.

- Rodríguez, M.; Latsague, Mirtha; Chacón, M. y Astorga, Pamela (2014): Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. Rev. Electrónica UACH Bosque (Valdivia) 35 (1).
- Srivastava, D.K.; Gambhir, G. and Sharma P. (2014): Chapter 3. Plant cell and tissue culture techniques in crop improvement. En: Biotechnology in agriculture and food processing. Opportunities and challenges. Ed. Panesar, P.S. Marwaha, S.S. CRC Press, EEUU.,75-119.
- Volnec, J.J.; Cunningham, S.M.; Haagenson, D.M.; Berg, W.K. y Joern, B.C. (2002): Physiological genetics of alfalfa improvement: past failure, future prospects. Field Crop Res., 75 (2): 97-110.
- Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, S.A., Mal boobi, M.A. y Habashi, A.K. (2009): Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. Journal of Food, Agriculture and Environment, 7 (3 & 4): 567 -572.
- Zhang, S. and Lemaux, P.G. (2004): Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. Rev. Crit. Rev. Plant. Sci., 23 (4): 325-335.
- Zimmerman, J. (1993): Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell, 5: 1411–1423.

Fecha de recepción: 29 noviembre 2016

Fecha de aceptación: 12 marzo 2017

Agrotecnia de Cuba
ISSN impresa: 0568-3114
ISSN digital: 2414- 4673
<http://www.ausuc.co.cu>

