Mexican Journal of Biotechnology

Journal homepage: www.mexjbiotechnol.com
ISSN:2448-6590

ORIGINAL RESEARCH

Mexican Journal of Biotechnology 2026, 11(3):65-82

In vitro culture in RITA bioreactors stimulates the physiological and biochemical development of the Persian lime

El cultivo *in vitro* en biorreactores RITA estimula el desarrollo fisiológico y bioquímico del limón Persa

Tania Marín-Garza, Miriam Cristina Pastelin-Solano, Odon Castañeda-Castro, José Guadalupe Vian-Pérez, Ignacio Sánchez-Bazán, Luis Alberto Solano-Rodríguez, Marisol Castillo-Morales, Rafael Uzárraga-Salazar, Javier Emanuel Bulbarela-Marini*

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Prolongación de Oriente 6 No. 1009, 94340, Orizaba, Veracruz, Mexico.

*Corresponding author
E-mail address: jbulbarela@uv.mx (J. E. Bulbarela-Marini)

Article history:
Received: 26 April 2026 / Received in revised form: 25 July 2026 / Accepted: 18 September / Published online: 24 September 2026.
https://doi.org/10.29267/mxjb.2026.11.3.65-82

ABSTRACT

The Persian lime (Citrus x latifolia) is of great importance because its international trade has grown in recent years and the cultivated area is increasing, generating greater demand for healthy and genetically pure plants. The Persian lime produces seedless fruit. The absence of seeds limits the sexual reproduction of this crop; asexual propagation, such as *in vitro* tissue culture, offers an excellent reproductive alternative. *In vitro* culture using temporary immersion systems with RITA® bioreactors promotes the multiplication of plants with phytosanitary quality. The objective of this study was to analyze the effect of RITA® bioreactors, semi-solid medium, and partial immersion on the *in vitro* culture of Persian lime, determining its morphological development, chlorophyll a, b, and total concentrations, phytohormones IBA, BAP, and KIN, and nutrients N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe, and B in plant tissue. In RITA® Bioreactors, the highest number of shoots, the highest concentration of BAP and KIN, macronutrients N, P and K and micronutrients Fe, Mn and B

were generated; the in vitro propagation of Persian lime in RITA® bioreactors is highly efficient.

Keywords: Citrus x latifolia, chlorophylls, nutrients, phytohormones, temporary immersion system.

RESUMEN

El limón Persa (*Citrus* x *latifolia*) tiene gran relevancia ya que su comercio internacional ha crecido en los últimos años y la superficie cultivada está aumentando, lo que genera mayor demanda de plantas sanas y genéticamente puras. El limón Persa produce frutos con ausencia de semillas. La ausencia de semillas limita la reproducción sexual de este cultivo, la propagación asexual como el cultivo *in vitro* de tejidos ofrece una excelente alternativa reproductiva. El cultivo *in vitro* a través de los sistemas de inmersión temporal con biorreactores RITA® promueve la multiplicación de plantas con calidad fitosanitaria. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de los biorreactores RITA®, medio semisólido e inmersión parcial en el cultivo *in vitro* de limón Persa determinar su desarrollo morfológico, concentración de las clorofilas a, b y total, fitohormonas AIB, BAP y KIN y de nutrimentos N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe y B en tejido vegetal. en Biorreactores RITA® se generó el mayor número de brotes, mayor concentración de BAP y KIN, macronutrimentos N, P y K y de los micronutrimentos Fe, Mn y B, la propagación *in vitro* de limón Persa en biorreactores RITA® es altamente eficiente.

Palabras clave: *Citrus* x *latifolia*, clorofilas, fitohormonas, nutrimentos, sistemas de inmersión temporal.

1. Introducción

El limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) es un limón ácido con características de calidad sobresalientes como la alta cantidad del jugo, sabor y ausencia de semillas donde el principal productor y exportador a nivel mundial es México (Raddatz-Mota *et al.,* 2019; López-Fortoso *et al*., 2021).

Sin embargo, existen enfermedades en el limón Persa como el Huanglongbing (HLB), también conocido como enverdecimiento de los cítricos asociada a bacterias del género *Candidatus* Liberibacter, que es una de las amenazas más graves para la producción de cítricos a nivel mundial, caracterizada por el amarillamiento de las hojas, la deformación de los frutos y la muerte de los árboles (Bové, 2006; Gottwald, 2010; Estrella-Maldonado *et al*., 2023; Ghosh *et al.,* 2023). Esta enfermedad sigue representando un riesgo importante para la producción citrícola mundial (Machado *et al.,* 2025). Otra enfermedad de alto riesgo es el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), que se considera el virus de mayor importancia económica para la industria citrícola, ya que causa un profundo impacto debido a que los cítricos son un producto agrícola importante a nivel mundial, con una producción que superó los 165 millones de toneladas en 2024 (FAOSTAT, 2026).

Los cítricos se cultivan a nivel global y su uso principal se relaciona con la elaboración de productos alimenticios a base de cítricos, como bebidas, frutas enlatadas y mermeladas, además de los posibles usos de los residuos, como la cáscara, en aplicaciones alimentarias industriales, ya que contiene diversos compuestos activos, como fibra dietética, pectina, proteínas, pigmentos, flavonoides y aceites esenciales (Huang *et al.,* 2019; Andrade *et al.,* 2022). La alta demanda de jugos cítricos, las cosechas desastrosas debido a condiciones climáticas extremas y las enfermedades de las plantas incentivan cada vez más el fraude alimentario (Jungen *et al.,* 2021; Negrea *et al*., 2025).

Los cítricos tienen un alto valor nutrimental y diversas investigaciones han demostrado sus propiedades beneficiosas en productos alimenticios a base de éstos para tratar algunas enfermedades degenerativas, como las cardiovasculares, reducción de glucemia, cáncer e hipertensión (Gupta *et al.,* 2021; Park y Shin, 2021). Estudios han demostrado las amplias aplicaciones de los compuestos bioactivos de los cítricos en muchas industrias, incluyendo la alimentaria, la cosmética y la farmacéutica, enfocadas en diferentes propiedades biológicas, como actividades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antidiabéticas (Liu *et al.,* 2021; Panwar *et al.,* 2021) y aceites esenciales que se utilizan principalmente en las industrias cosmética y de perfumería (Gaff *et al.,* 2020).

La propagación masiva del limón Persa a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite la obtención de plantas sanas en periodos de tiempo cortos (Bassan *et al.,* 2011; Curtis y Mirkov, 2012; Bulbarela-Marini *et al.,* 2022). Los sistemas de inmersión temporal (SIT) permiten una mayor proliferación de brotes de cítricos cultivados *in vitro*, además de que es posible su automatización (Albany de Vilchez *et al.,* 2015; Méndez-Hernández y Loyola-Vargas, 2024). El principio de la técnica de inmersión temporal se basa en la exposición de tejidos vegetales en medio de cultivo líquido en intervalos de inmersión muy específicos (Igarza *et al.,* 2015). Los biorreactores RITA® son los SIT más empleados y constan de un solo contenedor, el cual se encuentra dividido en dos compartimentos a través de un soporte, que mantiene separadas a las plántulas del medio líquido, por lo cual existe alta humedad relativa (Georgiev *et al.,* 2014; Carvalho *et al.,* 2019).

La micropropagación a través de los biorreactores RITA® permitieron obtener mayores tasas de micropropagación de *Leucojum aestivum* y *Dianthus caryophyllus*, en comparación con los sistemas semisólido e inmersión parcial (Ptak *et al.,* 2013; Ahmadian *et al.,* 2017). Además, en *Pistacia vera* y *Gerbera jamesonii* el número de brotes fue mayor y con mayor tamaño empleando el sistema RITA® en comparación con sistema de cultivo de inmersión parcial y semisólido (Akdemir *et al.,* 2014; Mosqueda-Frómeta *et al.,* 2017). En cítricos, los SIT han sido usados para desarrollar embriones somáticos (Cabasson *et al.,* 1997; Agisimanto *et al.,* 2019); y recientemente se han probado las ventajas de los sistemas RITA® (Bulbarela-Marini *et al.,* 2019), y Plantform en la micropropagación de cítricos (Cengiz y Kaçar, 2019).

La proliferación de brotes *in vitro* de cítricos como citrumelo (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*) se ha logrado con la adición de las citocininas 6-bencilaminopurina y kinetina (Pérez-Tornero *et al.,* 2010; Sen y Dhawan, 2010).

En el cultivo *in vitro* de cítricos, es importante asegurar una concentración adecuada de biomoléculas vitales para el buen funcionamiento de la planta. La abundancia de clorofilas es determinante en la fotosíntesis, lo que impacta la concentración de carbohidratos solubles en tejidos (Sanclemente y Peña, 2008) y finalmente el crecimiento y desarrollo de órganos (Iqbal *et al.,* 2017).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto de tres sistemas, biorreactores RITA®, semisólido, e Inmersión Parcial, de micropropagación para limón Persa en la generación de brotes, concentración de fitohormonas, clorofilas y nutrimentos en tejido vegetal.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal y medio de cultivo

Explantes de limón Persa (5 mm) provenientes del cultivo *in vitro*, fueron establecidos en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 1 mg L^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP; Sigma-Aldrich; Saint Louis, Estados Unidos), 0.5 mg L^{-1} de kinetina (KIN; Sigma-Aldrich; Saint Louis, Estados Unidos), 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Germany), 150 mg L^{-1} de ácido cítrico (Fermont; Monterrey, México), 30 g L^{-1} de sacarosa (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Estados Unidos) y para el caso específico del medio semisólido se agregó 2.7 g L^{-1} de Phytagel ™ (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Germany). El pH del medio fue ajustado a 5.7 y fue esterilizado en autoclave (Lab-Tech model LAC5060s; Namyangju, South Korea) a 120°C durante 15 min.

Los explantes se cultivaron en tres sistemas de cultivo *in vitro*; medio semisólido, medio líquido en inmersión parcial y biorreactores RITA® (VITROPIC; Saint-Mathieu-de-Tréviers, France). Los sistemas de cultivo semisólido e inmersión parcial contaron con 20 mL de medio de cultivo por explante en contenedores de 150 mL. Los biorreactores RITA® se colocaron con una frecuencia de inmersión de 4 h con 5 min de inmersión y 40 mL de medio por explante. Los cultivos se mantuvieron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad con luz blanca fluorescente y flujo de fotones de entre 40 y 50 µmol m^{-2} s^{-1} y temperatura ambiente de 25 ± 2°C durante 30 d.

Se cuantificó visualmente el número total de brotes, hojas y longitud de los brotes en centímetros.

2.2. Contenido de fitohormonas en plántulas de limón Persa cultivadas *in vitro*

La determinación de concentraciones de las fitohormonas 6-bencil amino purina (BAP), kinetina (KIN) y ácido indolbutírico (AIB) se realizó mediante la metodología descrita por Pan *et al.* (2010), moliendo 50 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido, al cual se le añadieron 500 µL de solución de 2-propanol: agua: HCl concentrado (2:1:0.002 v:v:v). La mezcla fue agitada por 30 min a 100 rpm a 4°C, y al finalizar la reacción se le agregó 1 mL de diclorometano y se repitió la agitación con las mismas condiciones. La mezcla resultante se centrifugó por 5 min a 13,000 g a 4°C y se tomaron 900 µL de la muestra y se concentró

con flujo de nitrógeno. Por último, la muestra se suspendió con 0.5 mL^{-1} de metanol, y se analizó mediante HPLC-UV/DAD con un HPLC (Agilent 1200; Santa Clara, CA, USA) con una columna fase reversa (Acclaim TM 120 C18 5 µm 4.6 x 150 mm) (ThermoFisher®; Sunnyvale, CA, USA) y una guarda columna ZORBAX C18 5 µm, 10 x 2 mm (Agilent; Santa Clara, CA, USA) a 280 nm, con fase móvil isocrática compuesta de metanol: agua (1:1) acidificado con H_3PO_4 aplicando un flujo de 1 mL min^{-1} a 60°C.

2.3. Contenido nutrimental en plántulas de limón Persa cultivadas *in vitro*

La concentración de N en las plántulas se determinó mediante el método micro-Kjeldahl y los nutrimentos P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Fe y B se cuantificaron siguiendo la metodología descrita por Alcántar y Sandoval (1999), mediante espectrofotometría de emisión óptica de inducción por plasma acoplado, en un equipo ICP-OES modelo 725 (Agilent; Mulgrave, Australia).

2.4. Cuantificación de clorofilas a, b y total en plántulas de limón Persa cultivadas *in vitro*

La cuantificación de clorofilas se realizó según la metodología descrita por Harborne (1973). Se tomaron 100 mg de material vegetal fresco, se le adicionaron 10 mL acetona al 80% y se cuantificó por espectrofotómetro (GENESYS™ 10S Vis Thermo Scientific™; Pittsburgh, PA, USA) en longitudes de onda de 663 y 645 nm.

2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2013).

3. Resultados

3.1. Evaluación morfológica de plántulas de limón Persa micropropagadas en diferentes sistemas

El presente estudio de micropropagación de limón Persa presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. En el tratamiento de biorreactores RITA® se generó el mayor número de brotes (2.77), el mayor tamaño (5.68 mm) y el mayor número de hojas (4.66), que se obtuvieron a través de los sistemas de inmersión parcial (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los diferentes sistemas de propagación *in vitro* en plántulas de limón Persa (*Citrus* x *latifolia*) después de 30 días de cultivo.

Table 1. Effect of different *in vitro* propagation systems on Persian lime (*Citrus* x *latifolia*) plantlets after 30 days of culture.

Sistema de propagación	Brotes (número)	Tamaño de brote (mm)	Hojas (número)
SS	1.40 ± 0.09^{b}	4.05 ± 0.12^{b}	3.14 ± 0.26^{b}
IP	1.32 ± 0.08^{b}	5.68 ± 0.57^{a}	4.66 ± 0.30^{a}
RITA®	2.77 ± 0.12^{a}	4.42 ± 0.35^{ab}	3.68 ± 0.26^{ab}

Medias con letras diferentes en las columnas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$). SS, sistema de cultivo en medio semisólido; IP, sistema de cultivo en inmersión parcial en medio líquido; RITA®, sistema de inmersión temporal en biorreactores RITA®.

3.2. Concentración de fitohormonas por efecto del sistema de propagación *in vitro* del limón Persa

Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos cuando se analizó la concentración de fitohormonas en el limón Persa cultivado *in vitro* y la mayor concentración de BAP y KIN (12.13 y 9.89 ng mg^{-1} pf) se presentó durante la micropropagación de limón Persa en los sistemas de inmersión temporal RITA®, la mayor concentración de AIB se encontró en el sistema de cultivo en inmersión parcial en medio liquido (4.13 ng mg^{-1}) (Fig. 1).

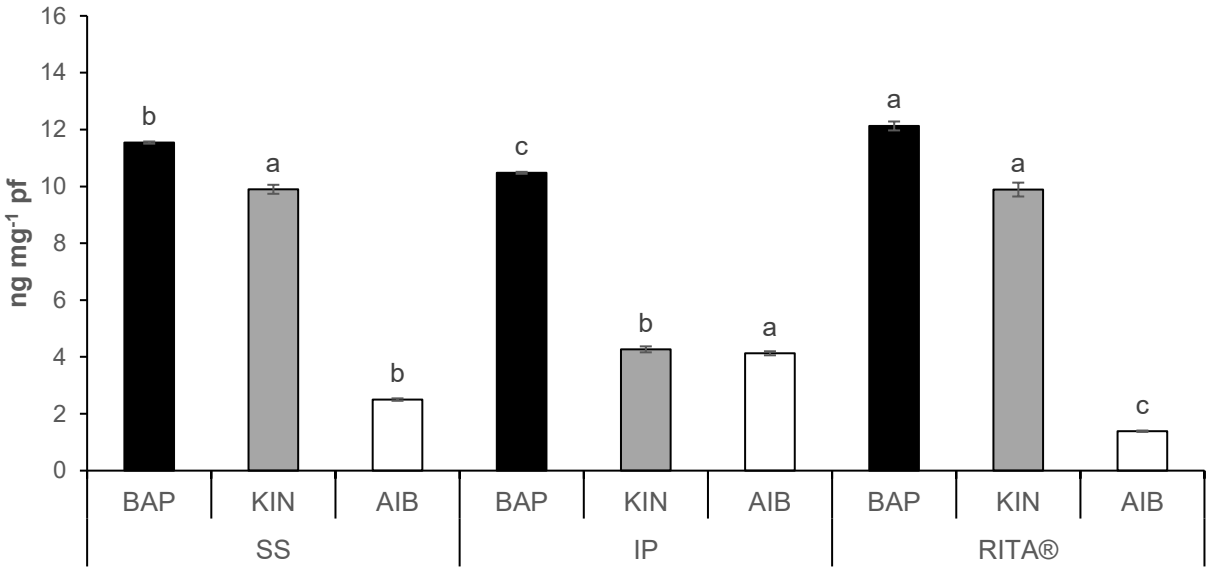


Fig. 1. Efecto de diferentes sistemas de propagación *in vitro* en el contenido de fitohormonas en brotes de limón Persa (*Citrus* x *latifolia*) después de 30 d. Líneas sobre las barras indican error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$). Peso fresco (pf). Sistema de cultivo en medio semisólido (SS), sistema de cultivo en inmersión parcial en medio líquido (IP), sistema de inmersión temporal en biorreactores RITA® (RITA®).

Fig. 1. Effect of different *in vitro* propagation systems on phytohormone content in Persian lime (*Citrus* x *latifolia*) shoots after 30 days. Lines above the bars indicate standard error. Different letters above the bars indicate a statistically significant difference ($p \leq 0.05$). FW = fresh weight (fw). Semisolid medium culture system (SS), partial immersion liquid medium culture system (IP), temporary immersion system using RITA® bioreactors (RITA®).

3.3. Concentración nutrimental por efecto del sistema propagación *in vitro* en plántulas de limón Persa

El sistema de inmersión temporal RITA® produjo las mayores concentraciones de N, P y K (32.25, 2.04 y 5.87 g kg^{-1}), en plántulas de limón Persa micropropagadas, mientras que la mayor concentración de Ca, Mg y S (7.34, 1.23 y 2.14 g kg^{-1}), se presentó en plántulas propagadas a través del sistema de inmersión parcial (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del sistema de propagación *in vitro* en el contenido de macronutrimentos en plántulas de limón Persa (*Citrus* x *latifolia*) después de 30 d de cultivo.

Table 2. Effect of the *in vitro* propagation system on the macronutrient content of Persian lime (*Citrus* x *latifolia*) plantlets after 30 days of culture.

Sistema de cultivo	Fe	Cu	Zn	Mn	B
			mg kg^{-1}		
SS	130.97±2.52^{b}	2.09±0.04^{c}	38.78±1.55^{c}	39.65±0.38^{c}	62.25±0.74^{c}
IP	262.27±1.51^{a}	3.05±0.05^{a}	78.39±3.04^{a}	62.38±1.08^{b}	133.56±1.50^{b}
RITA®	264.11±2.57^{a}	2.22±0.07^{b}	71.77±1.26^{b}	111.94±0.72^{a}	166.75±1.60^{a}

Medias con letras diferentes en las columnas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$). SS, sistema de cultivo en medio semisólido; IP, sistema de cultivo en inmersión parcial en medio líquido; RITA®, sistema de inmersión temporal en biorreactores RITA®.

El sistema de propagación *in vitro* de inmersión temporal RITA® resultó en la mayor concentración de Fe, Mn y B (264.11, 111.94 y 166.75 mg kg^{-1}) en las plántulas de limón Persa, mientras que la mayor concentración de Cu y Zn (3.05 y 78.39 mg kg^{-1}) se obtuvo en las plántulas propagadas con el sistema de inmersión parcial (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del sistema de propagación *in vitro* en el contenido de micronutrimentos en plántulas de limón Persa (*Citrus* x *latifolia*) después de 30 d de cultivo.

Table 3. Effect of the *in vitro* propagation system on the micronutrient content of Persian lime (*Citrus* x *latifolia*) plantlets after 30 days of culture.

Sistema de cultivo	N	P	K	Ca	Mg	S
			g kg^{-1}			
SS	16.82±0.13^{c}	1.13±0.02^{c}	2.85±0.05^{c}	6.18±0.22^{b}	0.92±0.04^{b}	1.22±0.02^{c}
IP	27.63±0.22^{b}	1.57±0.02^{b}	4.07±0.11^{b}	7.34±0.15^{a}	1.23±0.04^{a}	2.14±0.08^{a}
RITA®	32.25±0.44^{a}	2.04±0.03^{a}	5.87±0.20^{a}	2.40±0.10^{c}	0.69±0.02^{c}	1.90±0.06^{b}

Medias con letras diferentes en las columnas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$). SS, sistema de cultivo en medio semisólido; IP, sistema de cultivo en inmersión parcial en medio líquido; RITA®, sistema de inmersión temporal en biorreactores RITA®.

3.4. Concentración de clorofilas por efecto del sistema de propagación *in vitro* del limón Persa

La mayor concentración de clorofilas a, b y total (0.20, 0.11 y 0.32 mg g^{-1}) se obtuvo al propagar el limón Persa en el sistema de inmersión parcial, en comparación con los sistemas de cultivo *in vitro* con medio semisólido y con biorreactores RITA® (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de los sistemas de propagación *in vitro* de limón Persa (*Citrus* x *latifolia*) en el contenido de clorofilas después de 30 d de cultivo.

Table 4. Effect of *in vitro* propagation systems for Persian lime (*Citrus* x *latifolia*) on chlorophyll content after 30 days of culture.

Sistema de cultivo	Clorofila *a*	Clorofila *b*	Clorofila total
		mg g^{-1} (pf)	
SS	0.17 ± 0.01^{b}	0.08 ± 0.005^{b}	0.26 ± 0.01^{b}
IP	0.20 ± 0.01^{a}	0.11 ± 0.004^{a}	0.32 ± 0.01^{a}
RITA®	0.13 ± 0.01^{c}	0.08 ± 0.004^{b}	0.21 ± 0.01^{c}

Medias con letras diferentes en las columnas indican una diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$). SS, sistema de cultivo en medio semisólido; IP, sistema de cultivo en inmersión parcial en medio líquido; RITA®, sistema de inmersión temporal en biorreactores RITA®.

4. Discusión

4.1. Evaluación morfológica de plántulas de limón Persa micropropagadas en diferentes sistemas

El número de brotes obtenidos en nuestro estudio es similar a los reportados en *Gerbera jamesonii*, *Citrus* × *aurantium* y C-35 citrange (Mosqueda-Frómeta *et al*., 2017; Cengiz y Kaçar, 2019).

De acuerdo con Luczkiewicz *et al*. (2014) las citoquininas, como la BAP, desempeñan un papel esencial en la regulación de la proliferación de brotes y el metabolismo secundario en las plantas, además, Ravindran *et al.* (2023) mencionan que la eficacia de BAP, sola o en combinación con otras citoquininas o auxinas, para la proliferación de brotes en varias especies de *Hypericum*.

Grzegorczyk-Karolak *et al*. (2022) observaron que las plantulas de S. *viridis* multiplicados en biorreactores y sumergidos con mayor frecuencia en el medio presentaban un índice de proliferación de brotes más elevado que los sumergidos con menor frecuencia, a pesar de haber sido cultivados durante el mismo tiempo, lo que sugieren que este procedimiento permite la obtención de una mayor cantidad de material capaz de micropropagación posterior sin necesidad de estimular más la elongación de las yemas.

4.2. Concentración de fitohormonas (BAP, KIN, AIB) por efecto del sistema propagación *in vitro* del limón Persa

Las concentraciones de BAP y KIN están directamente relacionadas con el mayor número de brotes obtenidos a través de los biorreactores RITA®, lo cual concuerda con el efecto que estas sustancias ocasionan en las plantas, como lo fue en la generación de brotes de *Citrus jambhiri* (Savita *et al.,* 2015). De acuerdo con Clapa *et al*. (2025) entre las condiciones evaluadas en el cultivo de *Hypericum*, el medio MS suplementado con 0,2 mgL^{-1} de BA y un período de cultivo de 60 días resultaron ser los más eficaces para la proliferación de brotes.

La mayor concentración de AIB se presentó en el tratamiento con inmersión parcial donde se generaron los brotes con el mayor tamaño, lo cual puede ser debido a que las auxinas como AIB están relacionadas con la generación de raíces, la dominancia apical y el alargamiento de las plántulas en cítricos como citrange (Kaur *et al.,* 2015; Pérez *et al.,* 2015).

En nuestro estudio, en las plántulas que presentan el mayor contenido de citocinina se observa un bajo contenido de la auxina AIB. Esto puede deberse a que las auxinas y citocininas presentan antagonismos y tienen una regulación mutua de los niveles hormonales. Las citocininas aplicadas exógenamente o producidas endógenamente por la propia planta disminuyen los niveles de auxinas, y las auxinas aplicadas o producidas endógenamente reducen los niveles de las citocininas principales (Coenen *et al.,* 2003).

4.3. Contenido nutrimental por efecto del sistema propagación *in vitro* en plántulas de limón Persa

Se observo que el contenido de N, P, K, Fe, Mn y B fueron mayores en el tratamiento con RITA®. debido a que las plántulas en los biorreactores RITA®, tuvieron una disponibilidad mayor de estos componentes en comparación con los otros tratamientos porque el medio de cultivo líquido ayuda a una mejor difusión de los nutrientes, aunado a que el área de contacto vegetal con el medio de cultivo es mayor lo que permite una mejor absorción de nutrimentos en comparación con los otros tratamientos (López-Páez *et al*., 2022).

Nutrimentos como el N juega un rol importante en el desarrollo de las plantas, ejemplo de ello se muestra en los estudios realizados por Hua *et al*. (2024), en donde observaron que la deficiencia de N afectaba en el número de brotes y el contenido de hormonas relacionadas con el crecimiento de la planta tal como la 6-Bencilaminopurina (BAP), la cual estimula la división celular, promueve la formación de brotes y raíces, y retrasa el envejecimiento de las hojas (Da Silva y Magalhães, 2023; Hua *et al*., 2024).

Así mismo, el fósforo (P), desempeña funciones críticas en el metabolismo de los compuestos nitrogenados, en el transporte de carbohidratos, y en el metabolismo de las grasas y es esencial para el desarrollo de las plantas (Meng *et al*., 2021). Una deficiencia de P resulta en una reducción de la división celular, al igual que K, el cual participa en diversas actividades celulares y cuya deficiencia produce inhibición en el crecimiento y multiplicación de las plantas (Monib *et al*., 2023).

Lal y De (1951) mencionan que en la caña de azúcar, la deficiencia de N redujo la concentración de N en tallos y hojas, aumentó las concentraciones de P, K y Mg en hojas y P, Mg y S en raíces, disminuyó la concentración de Ca en raíces, pero tuvo poca influencia en las concentraciones de Ca y S en hojas y K en raíces, sin embargo en hojas, la deficiencia de N provocó un aumento en la relación de la concentración de P, K, Mg, Ca o S con respecto a la concentración de N, mientras que en los tallos, la deficiencia de N provocó una disminución en la relación de la concentración de N, K, Ca, Mg o S con respecto a P.

Micronutrimentos como Fe, Cu, Zn, Mn y B, cumplen funciones en células vegetales tales como formar moléculas que participan en la fotosíntesis, producción de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos y transporte de carbohidratos (Broadley *et al*., 2012). Ejemplo de ello es el B, el cual tienen una participación en la regulación del metabolismo, Kohli *et al.* (2023) observaron que la deficiencia de B es capaz de obstaculizar los diversos procesos relacionados con el N, tales como la fijación del nitrógeno, la asimilación del nitrógeno, la ingesta, el transporte y el secuestro de nitratos en muchas variedades de plantas.

Por lo que la mejor absorción de nutrimentos puede estar ligada a un mayor número de brotes en el tratamiento con RITA®, ya que la generación y calidad de los brotes estan relacionadas con la concentración de macro y micronutrimentos en el tejido vegetal (El-Hawaz *et al.,* 2016) los cuales fueron observados en mayor concentración en el tratamiento RITA®.

4.4. Concentración de clorofilas por efecto del sistema de propagación *in vitro* del limón Persa

Mandal *et al*. (2020) mencionan que la clorofila es un compuesto vital que permite a las plantas captar la luz solar para el proceso de fotosíntesis, y su concentración tiene un impacto directo en la tasa de crecimiento de las plantas.

Las concentraciones de clorofila a, b y total obtenidas en el presente trabajo coinciden con lo reportado en *Dianthus caryophyllus* y *Bergenia ciliata* (Genkov *et al.,* 1997; Rafi *et al.,* 2018). Se sabe que bajas concentraciones de clorofilas *in vitro* pueden deberse a que las condiciones del cultivo promueven plantas con reducida actividad fotosintética (Hazarika, 2006), además de que el exceso de Mn inhibe la biosíntesis de clorofila y aumenta la acumulación de Mn oxidado en el apoplasto de las hojas, causando así clorosis en las hojas jóvenes y necrosis (manchas marrones) en las hojas viejas (Li *et al*., 2019).

El contenido de clorofila indicó un impacto directo en la capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis, lo que provocó los síntomas visibles de amarillamiento de las hojas y una

disminución general del vigor de la planta. Porra, (2002) reportó que la cantidad de clorofila en las hojas es un indicador de la salud de la planta y la gama de colores verdes en las hojas reflejó notablemente la pérdida de clorofila causada por el enverdecimiento.

Cuando la eficiencia de la fotosíntesis en las hojas disminuye, hay una reducción posterior en la producción de carbohidratos, lo que lleva a una caída en la biomasa de los brotes (Shinichi y Ryan, 2015).

Probablemente el mayor número de hojas, el tamaño del brote y la mayor concentración de clorofila, con el tratamiento de inmersión parcial, se deban a que menos brotes significan menos competencia por la luz, el agua y los nutrimentos del medio de cultivo, lo que reduce el estrés en cada planta y promueve un crecimiento más vigoroso (Craine, 2013).

5. Conclusión

El aumento en la concentración de citocininas en el cultivo *in vitro* de limón Persa está relacionado con la generación de brotes obtenidos en biorreactores RITA®, además de que promueve el aumento en el contenido nutrimental. Los hallazgos aquí reportados pueden servir de base para implementar otros sistemas eficientes para la propagación *in vitro* en especies frutales u o leñosas.

Agradecimientos

Al Comité Ejecutivo Nacional Sistema Producto Limón Persa A. C. Cuitláhuac, Veracruz, México.

Contribución de los autores

Tania Marín-Garza: Investigación, redacción- borrador original. **Miriam Cristina Pastelin-Solano:** Redacción- revisión y edición. **Odon Castañeda-Castro:** Redacción- revisión y edición. **José Guadalupe Vian-Pérez:** Análisis formal. **Ignacio Sánchez-Bazán:** Redacción- revisión y edición. **Luis Alberto Solano-Rodríguez:** Redacción- revisión y edición. **Marisol Castillo-Morales:** Redacción- revisión y edición. **Rafael Uzárraga-Sañazar:** Redacción- revisión y edición. **Javier Emanuel Bulbarela-Marini:** Recursos, supervisión, conceptualización.

Referencias

Agisimanto, D., Normah, M.N. and Ibrahim, R. 2019. Rapid somatic embryogenesis of *Citrus reticulata* Blanco cv. Madu in an air-lift bioreactor culture. *Agrivita* 41 (2), 284–294. https://doi.org/10.17503/agrivita.v41i2.2237

Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S. and Hessami, S. 2017. Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15 (2), 309–315. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005

Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y. and Çiftçi, Y.O. 2014. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 117 (1), 65–76. https://doi.org/10.1007/s11240-013-0421-0

Albany-de-Vilchez, N.R., Vilchez, J.A., León-de-Sierralta, S., Nava-Fereira, A.R., Martínez-Ferrer, L.J. and Molina, M.A. 2015. Liquid medium culture: An approach for the commercial micropropagation of aloe (*Aloe barbadensis* Mill). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 17 (1), 24–31.

Alcántar, G.G. and Sandoval, V.M. 1999. *Manual de análisis químico de tejido vegetal: Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación*. Publicación Especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C., Chapingo, México.

Andrade, M.A., Barbosa, C.H., Shah, M.A., Ahmad, N., Vilarinho, F., Khwaldia, K., Sanches Silva, A. and Ramos, F. 2022. Citrus by-products: Valuable source of bioactive compounds for food applications. *Antioxidants* 12 (1), 38. https://doi.org/10.3390/antiox12010038

Bassan, M.M., Mourão Filho, F.A.A., Miyata, L.Y. and Januzzi-Mendes, B.M. 2011. *In vitro* organogenesis from internodal segments of adult sweet orange plants. *Pesq. Agropec. Bras.* 46 (6), 672–674. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600015

Bové, J.M., 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88 (1), 7–37.

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z. and Zhao, F. 2012. Function of nutrients: Micronutrients. In: Marschner, P. (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, third ed. Academic Press, London, pp. 191–248. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8

Bulbarela-Marini, J.E., Gómez-Merino, F.C., Galindo-Tovar, M.E., Solano-Rodríguez, L.A., Murguía-González, J., Pastelín-Solano, M.C., Núñez-Pastrana, R. and Castañeda-Castro, O. 2019. The *in vitro* propagation system of *Citrus* × *latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (Rutaceae) affects the growth and depletion of nutriments. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 55 (3), 290–295.

Bulbarela-Marini, J.E., Gómez-Merino, F.C., Galindo-Tovar, M.E., Pastelín-Solano, M.C., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R. and Castañeda-Castro, O. 2022. Ratio of somaclonal variation and the phytohormonal content of *Citrus* × *latifolia* in three *in vitro* culture systems. *J. Plant Growth Regul.* 42, 3356–3364. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10796-x

Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P. and Teisson, C. 1997. Improvement of citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 50 (1), 33–37. https://doi.org/10.1023/A:1005896725780

Carvalho, L.S.O., Ozudogru, E.A., Lambardi, M. and Paiva, L.V. 2019. Temporary immersion system for micropropagation of tree species: A bibliographic and systematic review. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 47 (2), 269–277. https://doi.org/10.15835/nbha47111305

Cengiz, M. and Kaçar, Y.A. 2019. Micropropagation of some citrus rootstocks with classical and new generation tissue culture techniques. *Turk. J. Agric. Food Sci. Technol.* 7 (9), 1469–1478. https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1469-1478.2846

Clapa, D., Hârţa, M., Radomir, A.M., Peticilă, A.G., Leopold, L., Ranga, F. and Sumedrea, D.I. 2025. Effects of culture period and plant growth regulators on *in vitro* biomass production and phenolic compounds in seven species of *Hypericum*. *Plants* 14 (15), 2437. https://doi.org/10.3390/plants14152437

Coenen, C., Christian, M., Lüthen, H., Lomax, T.L. 2003. Cytokinin inhibits a subset of diageotropica-dependent primary auxin responses in tomato. *Plant Physiol.* 131 (4), 1692–1704. https://doi.org/10.1104/pp.102.016196

Craine, J.M. and Dybzinski, R. 2013. Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Funct. Ecol.* 27 (4), 833–840. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12081

Curtis, I.S. and Mirkov, T.E. 2012. Influence of surfactants on growth and regeneration from mature internodal stem segments of sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 108 (2), 345–352. https://doi.org/10.1007/s11240-011-0037-1

Da Silva, L.I. and Magalhães, H.M. 2023. Growth regulators alter the development and metabolism of lemon balm seedlings cultured *in vitro*. *Rev. Caatinga.* 36 (2), 372–380.

El-Hawaz, R., Park, D., Bridges, W.C. and Adelberg, J. 2016. Optimizing *in vitro* mineral nutrition and plant density increases greenhouse growth of *Curcuma longa* L. during acclimatization. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 126, 33–42.

Estrella-Maldonado, H., González-Cruz, C., Matilde-Hernández, C., Adame-García, J., Santamaría, J. and Santillán-Mendoza, R. 2023. Insights into the molecular basis of Huanglongbing tolerance in Persian lime (*Citrus latifolia* Tan.) through a transcriptomic approach. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (8), 7497. https://doi.org/10.3390/ijms24087497

FAOSTAT, 2026. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. https://www.fao.org/faostat/es/#data/QI, [accessed September 23, 2026].

Gaff, M., Esteban-Decloux, M., Giampaoli, P. 2020. Bitter orange peel essential oil: A review of the different factors and chemical reactions influencing its composition. *Flavour Fragr. J.* 35 (3), 247–269. https://doi.org/10.1002/ffj.3570

Genkov, T., Tsoneva, P., Ivanova, I. 1997. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. *J. Plant Growth Regul.* 16 (3), 169–172. https://doi.org/10.1007/pl00006992

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* 14 (6), 607–621. https://doi.org/10.1002/elsc.201300166

Ghosh, D., Kokane, S., Savita, B.K., Kumar, P., Sharma, A.K., Ozcan, A. and Santra, S. 2022. Huanglongbing pandemic: Current challenges and emerging management strategies. *Plants* 12 (1), 160. https://doi.org/10.3390/plants12010160

Gupta, A.K., Dhua, S., Sahu, P.P., Abate, G., Mishra, P. and Mastinu, A. 2021. Variation in phytochemical, antioxidant and volatile composition of pomelo fruit (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) during seasonal growth and development. *Plants* 10 (9), 1941. https://doi.org/10.3390/plants10091941

Gottwald, T.R. 2010. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 119–139. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418

Grzegorczyk-Karolak, I., Staniewska, P., Lebelt, L. and Piotrowska, D.G. 2022. Optimization of cultivation conditions of *Salvia viridis* L. shoots in the Plantform bioreactor to increase polyphenol production. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 149, 269–280. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02168-2

Harborne, J.B. 1973. Recommended techniques, chlorophyll estimation. In: Harborne, J.B. (Ed.), *Phytochemical Methods*. Chapman & Hall, London, pp. 205–207.

Hazarika, B.N. 2006. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Sci. Hortic.* 108 (2), 105–120. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038

Hua, D., Rao, R.Y., Chen, W.S., Yang, H., Shen, Q., Lai, N.W., Yang, L.T., Guo, J., Huang, Z.R. and Chen, L.S. 2024. Adaptive responses of hormones to nitrogen deficiency in *Citrus sinensis* leaves and roots. *Plants.* 13 (14), 1925. https://doi.org/10.3390/plants13141925

Huang, J.H., Xu, J., Ye, X., Luo, T.Y., Ren, L.H., Fan, G.C., Qi, Y.P., Li, Q., Ferrarezi, R.S. and Chen, L.S. 2019. Magnesium deficiency affects secondary lignification of the vascular system in *Citrus sinensis* seedlings. *Trees.* 33 (1), 171–182. https://doi.org/10.1007/s00468-018-1766-0

Igarza, J., Feria, M., Alvarado-Capó, Y., Pugh, T., Jaime, J., Pérez, M., San-Román, M. and Agramonte, D. 2015. Effect of explant type and immersion frequency on potato microtubers cv. Andinita production in temporary immersion systems. *Biotecnol. Veg.* 15 (2), 105–114.

Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A. and Mir, K. 2017. Ethylene role in plant growth, development and senescence: Interaction with other phytohormones. *Front. Plant Sci.* 8, 475. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475

Jungen, M., Lotz, P., Patz, C.D., Steingass, C.B. and Schweiggert, R. 2021. Coumarins, psoralens, and quantitative 1H-NMR spectroscopy for authentication of lemon (*Citrus limon* [L.] Burm. f.) and Persian lime (*Citrus* × *latifolia* [Yu. Tanaka] Tanaka) juices. *Food Chem.* 359, 129804. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129804

Kaur, M., Dhaliwal, H.S., Thakur, A., Singh, G. and Kaur, M. 2015. *In vitro* plantlet formation in Carrizo citrange: A promising citrus rootstock. *Indian J. Hortic.* 72 (1), 1–6. https://doi.org/10.5958/0974-0112.2015.00001.8

Kohli, S.K., Kaur, H., Khanna, K., Handa, N., Bhardwaj, R., Rinklebe, J. and Ahmad, P. 2023. Boron in plants: Uptake, deficiency and biological potential. *Plant Growth Regul.* 100 (2), 267–282. https://doi.org/10.1007/s10725-022-00844-7

Lal, K.N. and De, R. 1951. Elemental composition of sugar-cane leaf and stem in relation to nitrogen deficiency. *Nature.* 167, 731–732. https://doi.org/10.1038/167731a0

Li, J., Jia, Y., Dong, R., Huang, R., Liu, P., Li, X., Wang, Z., Liu, G. and Chen, Z. 2019. Advances in the mechanisms of plant tolerance to manganese toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (20), 5096. https://doi.org/10.3390/ijms20205096

Liu, Y., Benohoud, M., Yamdeu, J.H.G., Gong, Y.Y. and Orfila, C. 2021. Green extraction of polyphenols from citrus peel by-products and their antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Food Chem. X.* 12, 100144. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100144

López-Fortoso, F., González-Arnao, M.T., Bulbarela-Marini, J.E., Pastelín-Solano, M.C., Guevara-Valencia, M., Rascón-Díaz, P., Cruz-Cruz, C.A. and Castañeda-Castro, O. 2021. Characterization in clonal selections of *Citrus* × *latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez. *Agro Productividad.* 14 (3). https://doi.org/10.32854/agrop.v14i3.1798

López-Páez, F.K., Murguía-González, J., Castañeda-Castro, O., Pastelín-Solano, M.C. and Galindo-Tovar, M.E. 2022. Nutrición *in vitro* de anturio (*Anthurium andreanum* Linden var. Tropical) en tres sistemas de cultivo. *Mex. J. Biotechnol.* 7 (3), 1–14. https://doi.org/10.29267/mxjb.2022.7.3.1

Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A. and Glod, D. 2014. Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive *in vitro* cultures of *Genista tinctoria*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 118, 419–429. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0494-4

Machado, R., Moschen, S., Conti, G., González, S.A., Rivarola, M., Gómez, C. and Fernández, P. 2025. Exploring the genetic networks of HLB tolerance in citrus: Insights across species and tissues. *Plants.* 14 (12), 1792. https://doi.org/10.3390/plants14121792

Mandal, R. and Dutta, G. 2020. From photosynthesis to biosensing: Chlorophyll proves to be a versatile molecule. *Sensors Int.* 1, 100058. https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100058

Méndez-Hernández, H.A. and Loyola-Vargas, V. 2024. Plant micropropagation and temporary immersion systems. In: Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N. (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols*. Springer, New York, pp. 35–50. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3954-2_3

Meng, X., Chen, W.W., Wang, Y.Y., Huang, Z.R., Ye, X., Chen, L.S. and Yang, L.T. 2021. Effects of phosphorus deficiency on the absorption of mineral nutrients, photosynthetic system performance and antioxidant metabolism in *Citrus grandis*. *PLoS One.* 16 (2), e0246944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246944

Monib, A.W., Alimyar, O., Mohammad, M.U., Akhundzada, M.S. and Niazi, P. 2023. Macronutrients for plants growth and humans health. *J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* 2 (2), 268–279. https://doi.org/10.55544/jrasb.2.2.38

Mosqueda-Frómeta, O., Escalona-Morgado, M.M., Teixeira-da-Silva, J.A., Pina-Morgado, D.T. and Daquinta-Gradaille, M.A. 2017. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 129 (3), 543–551.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3), 473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Negrea, M., Cocan, I., Jianu, C., Alexa, E., Berbecea, A., Poiană, M.A. and Silivasan, M. 2025. Valorization of citrus peel byproducts: A sustainable approach to nutrient-rich jam production. *Foods.* 14 (8), 1339. https://doi.org/10.3390/foods14081339

Pan, X., Welti, R. and Wang, X. 2010. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 5, 986–992. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37

Panwar, D., Panesar, P.S. and Chopra, H.K. 2021. Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products. *Food Rev. Int.* 37 (1), 91–120. https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695834

Park, H.R. and Shin, K.S. 2021. Inhibitory effects of orally administered pectic polysaccharides extracted from the citrus Hallabong peel on lung metastasis. *Food Biosci.* 43, 101301.

Pérez, L.P., Montesinos, Y.P., Olmedo, J.G., Sánchez, R.R., Montenegro, O.N., Rodríguez, R.B., Ribalta, O.H., Escriba, R.C.R., Daniels, D. and Gómez-Kosky, R. 2015. Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support. *Afr. J. Biotechnol.* 14 (35), 2622–2635. https://doi.org/10.5897/AJB2015.14814

Pérez-Tornero, O., Tallón, C.I. and Porras, I. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100 (3), 263–271. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9643-6

Ptak, A., Simlat, M., Kwiecień, M. and Laurain-Mattar, D. 2013. *Leucojum aestivum* plants propagated *in vitro* bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Eng. Life Sci.* 13 (3), 261–270. https://doi.org/10.1002/elsc.201200109

Raddatz-Mota, D., Franco-Mora, O., Mendoza-Espinoza, J.A., Rodríguez-Verástegui, L.L., de León-Sánchez, F.D. and Rivera-Cabrera, F. 2019. Effect of different rootstocks on Persian lime (*Citrus latifolia* T.) postharvest quality. *Sci. Hortic.* 257, 108716. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108716

Rafi, S., Kamili, A.N., Ganai, B.A., Mir, M.Y. and Parray, J.A. 2018. *In vitro* culture and biochemical attributes of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 88 (2), 609–619. https://doi.org/10.1007/s40011-016-0797-9

Ravindran, B.M., Rizzo, P., Franke, K., Fuchs, J. and D'Auria, J. 2023. Simple and robust multiple shoot regeneration and root induction cycle from different explants of *Hypericum perforatum* L. genotypes. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 152, 1–15. https://doi.org/10.1007/s11240-022-02370-w

Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth. Res.* 73 (1–3), 149–156. https://doi.org/10.1023/A:1020470224740

Sanclemente, M.A. and Peña, E.J. 2008. Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (Onagraceae) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Acta Biol. Colomb.* 13 (1), 175–186.

SAS Institute. 2013. *The SAS System for Windows*, version 9.4. SAS Institute, Cary, NC.

Savita, Pati, P.K., Virk, G.S. and Nagpal, A. 2015. An efficient somatic embryogenesis protocol for *Citrus jambhiri* and assessment of clonal fidelity of plantlets using RAPD markers. *J. Plant Growth Regul.* 34 (2), 309–319. https://doi.org/10.1007/s00344-014-9465-6

Sen, S. and Dhawan, V. 2010. Development of a highly efficient micropropagation method for the citrus rootstock Swingle citrumelo [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *C. paradisi* McFaden]. *Int. J. Fruit Sci.* 10, 65–78. https://doi.org/10.1080/15538361003676801

Shinichi, A. and Ryan, M.G. 2015. Carbohydrate regulation of photosynthesis and respiration from branch girdling in four species of wet tropical rain forest trees. *Tree Physiol.* 35, 608–620.