

REGULADORES DE CRECIMIENTO, L-CISTEÍNA Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE MORA (*Rubus glaucus* Benth)

José Dolores Cisne Contreras¹, Ileana Muñoz², Heidy Reyes².

¹ Investigador del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses, Universidad Nacional Agraria

² Ing. Agrónomos, egresados de la Universidad Nacional Agraria.



RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua, con el objetivo de adoptar la técnica de propagación *in vitro* del cultivo de mora e introducir la variedad Rizaralda. El material vegetal fue traído de la Universidad Nacional de Pereira, Colombia. Los explantes fueron desinfectados y establecidos en un medio MS semisólido suplementado con 1 mg/l de BAP y 0.3 mg/l de GA₃. El ensayo se desarrolló en dos fases. En la primera fase (fase de multiplicación) se evaluaron diferentes concentraciones de las fitohormonas BAP y GA₃; la vitamina ácido ascórbico y el aminoácido (L-cisteína). La combinación hormonal BAP 2.5 mg/l y GA₃ 0.03 mg/l fue el mejor tratamiento, lográndose una producción de hijos de 3.13 en promedio. En la segunda fase (enraizamiento) se evaluaron las fitohormonas AIA, IBA y ANA, así como la consistencia del medio; obteniéndose un 100 % de plantas enraizadas con un promedio de 6.98 raíces por planta con 1.4 mg/l de IBA en medio semisólido.

ABSTRACT

The present study was carried out in the laboratory of plants tissue culture from the department of Plant Genetic Resources (REGEN), Faculty of Agronomy, National Agrarian University, Managua, Nicaragua, with the objective of adopting a new *in vitro* propagation technique for blackberry (*Rubus glaucus*), and to introduce the cultivar Rizaralda. The propagation material was brought from the National University of Pereira, Colombia. The tissues were disinfested and settled down in a MS semisolid culture medium supplemented with 1 mg/l of BAP and 0.3 mg/l of GA₃. The experiment was developed into two phases. In the first phase, different concentrations of hormones BPA were evaluated with GA₃; vitamin ascorbic acid and amino acid (L-Cistein). The hormonal combination BPA 2.5 mg/l and GA₃ 0.03 mg/l was the best treatment, with the biggest production of buds with an average of 3.13. In the second phase the hormones; IAA, IBA and NAA were evaluated as well as the consistency of the culture medium obtaining 100 % of plants forming roots with an average of 6.98 per plant with 1.4 mg/l of AIB in semisolid culture medium.

La mora (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia rosaceae y es originaria del trópico americano. Es una alternativa con un alto potencial económico para los productores de las zonas altas cafetaleras de Nicaragua, ya que este cultivo puede ser comercializado para diferentes usos en la industria de alimentos, tales como la preparación de helados, edulcorantes, composta casera, jugos, yogurt y mermelada, también puede ser comercializada como fruta fresca (Franco y Giraldo 1999).

En Nicaragua hace 20 años, veinte agricultores de hortalizas y café en el norte del país (Somoto, Ocotal, Jinotega y Matagalpa) incursionaron en la producción de mora. Les fue bien en los primeros años, pero posteriormente empezaron a tener problemas y prácticamente perdieron el mercado. El fracaso del cultivo, en parte se debió principalmente a la poca disponibilidad de materiales genéticos (Sánchez, 2004). El cultivo de mora se reinició nuevamente en el norte del país, aproximadamente hace unos tres años. Las principales áreas cultivadas se encuentran ubicadas en el departamento de Madriz. En la actualidad solo se ha estado cultivando la variedad "BRAZO".

Ante esta situación los agricultores y técnicos que trabajan con el cultivo de mora plantearon la necesidad de introducir nuevos materiales genéticos para evaluarlos en el campo, reducir los costos de producción e incrementar la calidad y los rendimientos del cultivo.

Ante esta fuerte demanda de germoplasma del cultivo de mora, se implementó la técnica de cultivo de tejidos como método para la introducción y propagación acelerada de variedades de alta calidad y altos rendimientos. En este sentido la Universidad Nacional Agraria, con el auspicio financiero del Fondo Agropecuario de Investigación Tecnológica Nicaragüense (FAITAN) y con la colaboración de la Universidad Tecnológica de Pereira inició la introducción de materiales genéticos de mora oriundos de Colombia, con el fin de ampliar la base genética de esta especie.

MATERIALES Y METODOS

Descripción del estudio. El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Ubicada en el km. 12 ½ carretera norte, departamento de Managua; en el período comprendido entre Agosto 2004 a Abril del 2005.

El estudio se desarrolló en dos fases. En la primera fase se ejecutaron evaluaciones de componentes del medio de cultivo de multiplicación acelerada, mediante la utilización de micro esquejes. En la segunda fase se indujo el enraizamiento de vitro plantas por un periodo de 6 semanas.

Material vegetativo. El material vegetativo utilizado fue tomado de plantas ya establecidas *in vitro*, de la variedad Rizaralda, provenientes de la Unidad de biotecnología, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), Colombia.

Fase I: Multiplicación. En esta primera fase se llevaron a cabo 3 ensayos. Evaluando el efecto de: 6-bencil aminopurina (BAP) y ácido giberélico; el efecto de ácido ascórbico y el efecto de L-cisteina sobre el comportamiento *in vitro* de micro esqueje de mora en la fase de multiplicación acelerada.

Tabla 1. Niveles de citoquinina y ácido giberélico evaluados.

Tratamiento N°	Concentraciones hormonales (mg/l)	
	BAP	GA ₃
I	1.0	0.00
II	1.0	0.01
III	2.0	0.00
IV	2.0	0.01
V	2.0	0.00
VI	2.5	0.03

Tabla 2. Concentraciones de ácido ascórbico y L-cisteina evaluados en el cultivo *in vitro* de mora.

Tratamiento N°	Concentraciones ácido ascórbico mg/l	Concentraciones de L-cisteina .mg/l
I	0.00	0.00
II	50.0	50.0
III	100.0	100.0
IV	150.0	150.0

Los ensayos se establecieron en diseños completos al azar (DCA); con 10 repeticiones, colocando 1 microesquejes de vitro plantas de mora en 10 ml de medio nutritivo semisólido. Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente se hizo una separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) para determinar entre cuales de los tratamientos se reflejaba diferencias estadísticas. Se evaluaron las variables longitud del callo, formación de callo, número de hijos, número de hojas y número de nudos.

Fase II: Enraizamiento. En esta fase se realizaron 3 ensayos experimentales. Donde se evaluó el efecto del ácido

Tabla 3. Niveles de AIA (ácido indolacético) evaluados en el cultivo *in vitro* de mora y concentraciones de AIA en medio semisólido y líquido evaluados en el cultivo *in vitro* de mora.

Tratamiento N°	AIA (mg/l)	Concentración AIA (mg/l)
I	0.5	1.0 Medio sólido
II	1.0	1.0 Medio líquido
III	1.5	1.5 Medio sólido
IV	2.0	1.5 Medio líquido

indolacético, ácido idolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA) y la consistencia del medio basal, en un periodo de 6 semanas, en el cual el material vegetativo utilizado fue tomado de plantas multiplicadas en la fase I.

Tabla 4. Concentraciones de AIA, IBA y ANA evaluados en el cultivo *in vitro* de mora.

Tratamiento N°	Concentración (mg/l)
I	1.0 IBA
II	0.2 ANA
III	1.0 AIA

Los ensayos se establecieron en diseños completos al azar (DCA); con 15 repeticiones, colocando 6 vitro plantas de mora en 20 ml de medio nutritivo. Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente se hizo una separación de medias de Tukey ($\infty = 0.05$) para determinar en cual de los tratamientos existía diferencias estadística significativa. Se evaluaron las variables formación de raíz, porcentaje de plantas enraizadas y longitud del tallo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de multiplicación. En el cultivo de mora la propagación sexual no es recomendable debido a la baja fertilidad de las semillas, el largo período de germinación y el lento desarrollo de las plántulas. Actualmente la propagación se realiza por la vía asexual (acodo y estaca); pero éste presenta dificultades en la etapa de enraizamiento y brotes de las primeras hojas y ramas, ya que esta agota sus reservas y pierde vigor para continuar su desarrollo (Montoya *et. al.*, 1997). Por otro lado, la movilización de estacas o plantas representa un medio apropiado para la diseminación de insectos y micro-organismos perjudiciales para la agricultura. En busca de ofrecer plantas de mora en cantidad suficiente y de buena calidad genética y fitosanitaria es conveniente realizar una propagación *in vitro* en determinados momentos y eslabones del ciclo productivo del cultivo de mora. Las técnicas del cultivo *in vitro* es un instrumento de gran importancia para propagar masivamente plantas de alta calidad, en condiciones controladas y pequeño espacio a diferencia del método convencional.

Ácido giberélico y 6, bencilaminopurina. En la multiplicación *in vitro* las citoquininas son un componente importante en el medio de cultivo de establecimiento y de multiplicación, debido a que promueven la división celular, proliferación de yemas axilares y neoformación de órganos *in vitro* (Azcon, 2000; García y Martínez, 1994; Saldívar, 1994). En el caso específico del cultivo de mora se ha evaluado la hormona sintética 6-bencil aminopurina (BAP); resultando una de las más eficientes para estimular el crecimiento y desarrollo, división celular, alargamiento celular, iniciación y crecimiento de brotes (Rojas y Ramírez, 1991).

En respuesta al BAP y GA₃ la variable longitud de tallo mostró las mayores alturas en niveles en los que las concentraciones de BAP estuvieron por debajo de los 2 mg/l. Así se puede notar en la Figura 1, que la mayor longitud de tallo se presentó bajo el tratamiento 1, lográndose obtener plantas alargadas, débiles y de color verde pálido. Por el contrario, se

observaron plantas más pequeñas a mayor concentración de dicha hormona.

Presentándose la menor longitud de tallo en concentraciones de 2.5 mg/l BAP en combinación con 0.03 mg/l GA₃. También se observó que el mayor número de hojas se presentó en el tratamiento 6. Por otra parte, el análisis estadístico reflejó que no hubo diferencia significativas para la variable número de nudos. En cuanto al número de hijos la mayor producción fue en el tratamiento 6, con plantas más vigorosas robustas y de coloración verde claro (Figura 1).

López y García (1991), propagaron *in vitro* cuatro variedades de frambuesa en medio Anderson y evaluaron con 2,0 mg/l de BAP obteniendo buenos resultados en cuanto al número de yemas por explante que van desde 3,6 a 3,8. Una respuesta similar se obtuvo en el presente trabajo al evaluar 2.5 mg/l de BAP en el que se logró un promedio de 4.13 nudos y 3.13 hijos; pero mucho menor que los resultados obtenidos por Marulanda (2000), quien reporta 13.6 yemas por explante en un medio MS suplementado con 1.5 mg/l de BAP y 1.5 mg/l de GA₃.

Las giberelinas son importantes en el cultivo de tejidos vegetales ya que presentan un espectro de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, ya que este puede producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos (Hurtado y Merino, 1994).

Este comportamiento se reflejó en el cultivo de mora ya que las mayores alturas se establecieron a niveles sumamente bajos de AG₃. En la mayoría de los cultivos, los niveles de AG₃ superiores a 1.0 mg/l son tóxicos por lo que es recomendable utilizarlo en bajos concentraciones (Van Braga y Pierik, 1971). En el presente ensayo la utilización de AG₃ presentó mejores resultados a niveles de 0.03 mg/l en combinación de 2.5 mg/l de BAP, brindando una mayor producción de hojas e hijos.

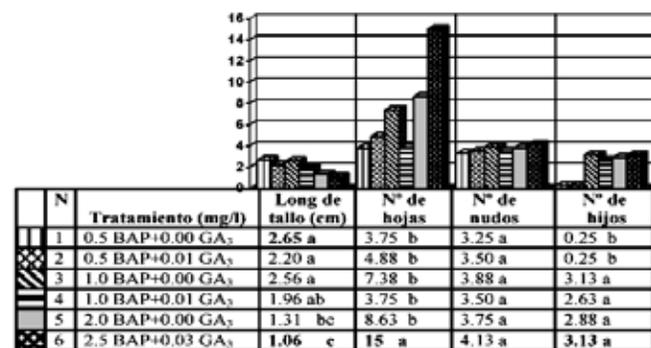


Figura 1. Efecto de 6, bencilaminopurina y ácido giberélico sobre longitud de tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos.

Ácido ascórbico. El análisis estadístico realizado a las variables longitud del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos expresó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Registrándose la mayor longitudes de tallo en concertaciones de 100 mg/l de ácido ascórbico y el máximo número de hojas, nudos e hijos en el rango 00 a 50 mg/l de ácido ascórbico como se muestra en la Figura 2.

Con respecto a la función del ácido ascórbico en la propagación masiva de plantas *in vitro* puede actuar en dos formas como reductor o como vitamina. Como agente reductor retrasa la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben

el crecimiento (Arditti, 1966; Vacin y Went, 1949; Nitsch, 1954). Como vitamina estimula el proceso de crecimiento (Hurtado y Merino, 1994). Sin embargo y según el ensayo realizado en el presente trabajo el ácido ascórbico no tuvo ningún efecto estimulador sobre las variables evaluadas, aunque este pudo haber tenido cierto efecto sobre la inhibición de sustancia fenólicas.

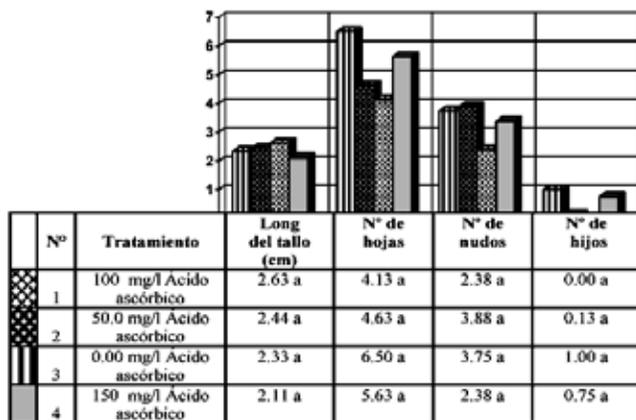


Figura 2. Efecto de Ácido ascórbico sobre el crecimiento del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos.

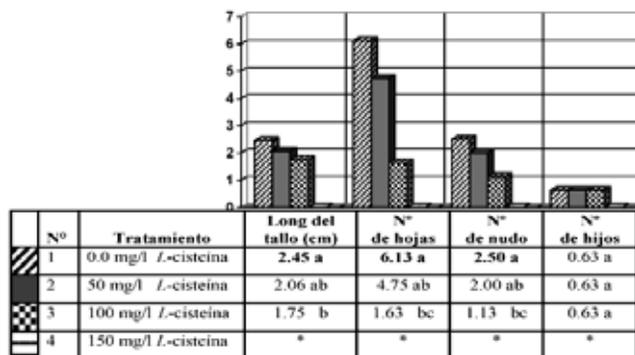
L- cisterna. El análisis realizado a la variable longitud del tallo refleja que las mayores longitudes estuvieron influenciadas por concentraciones bajas de L-cisteína (tratamientos 1 y 2) menores a 100 mg/l. Respecto al número de hojas y número de nudos se pudo observar que las mayores fueron alcanzadas a concentraciones de 0.0 mg/l de L-cisteína, obteniéndose plantas de poco grosor y de color verde pálido. En el análisis de la variable número de hijos no hubo diferencias significativas entre los tratamientos como se observa en la Figura 3. Sin embargo, concentraciones de 150 mg/l provocó la muerte de todos los microesquejes.

Aunque las proteínas de las plantas contienen cantidades bajas de aminoácidos sulfúricos como la cisteína y la metionina (Durzan y Steward, 1983), estos son necesarios para un crecimiento y desarrollo normal.

Por otra parte, el utilizar aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar que muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos (Roca y Mroginski., 1991).

Se ha demostrado que la cisteína puede tener dos efectos completamente diferentes según la modalidad de esterilización (Nitsch y Nitsch, 1957); cuando se esteriliza con filtro, es inhibidor a nivel de 1-2 μ mol, y cuando se usa la autoclave, aparentemente se descompone y actúa como una fuente de azufre. Probablemente en el caso de los explantes de mora de Castilla cultivados en concentraciones de mayores a los 100 mg/l, esta fue tóxica provocando la muerte de las plantas aun y cuando se esterilizó en la autoclave.

Fase de enraizamiento. Ácido indolacético. De acuerdo al análisis de varianza realizado a los datos de la variable longitud del tallo se determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a los diferentes niveles de AIA. Las mayores alturas se obtuvieron con concentraciones 2.0 mg/l AIA y plantas de menor tamaño a concentraciones de



(*) = 100 % de las plantas no sobrevivieron.

Figura 3. Efecto de L-cisteína sobre el crecimiento del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos.

1.5 mg/l AIA siendo éstas más verdes y robustas. El análisis realizado a la variable número de raíces por planta demostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos analizados, pero se observó una mayor producción de raíces bajo el tratamiento 1 como se indica en la Figura 4.

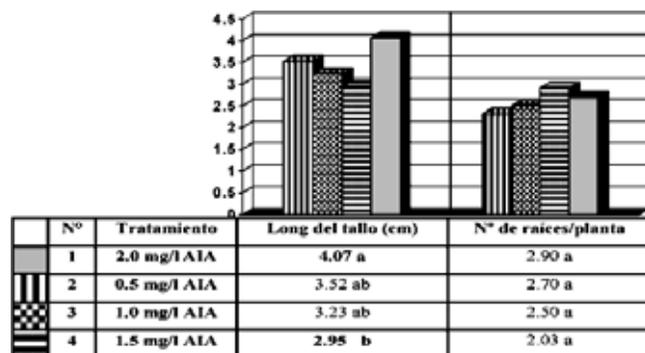


Figura 4. Efecto del Ácido indolacético sobre el crecimiento del tallo y formación de raíces.

Ácido indolacético en medio semi sólido y líquido. El análisis realizado bajo de la prueba de Tukey a las variables número de raíces por planta y porcentaje de plantas enraizadas demostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en cuanto a los medios basales bajo estudio; sin embargo hubo mayor producción de raíces así como mayor cantidad de plantas que enraizaron a través del tratamiento 1, como se refleja en el gráfico de la Figura 5.

Ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético. Según el análisis de varianza realizado a la variable número de raíces por planta determino que existe diferencias significativas entre los tratamiento demostrando que se produjo mayor cantidad de raíces por planta a concentraciones de 1.0 mg/l IBA y menores cantidades en el tratamiento 3. El análisis realizado a la variable porcentaje de plantas enraizadas demostraron que a concentraciones de 1.0 mg/l IBA hubieron más plantas que enraizaron en comparación con los niveles de 0.2 mg/l ANA y 1.0 mg/l AIA como se refleja en la Figura 6.

El éxito del cultivo de tejidos vegetales, en gran parte, depende del medio de cultivo empleado. En el caso concreto de la micropropagación es vital la definición de los medios de

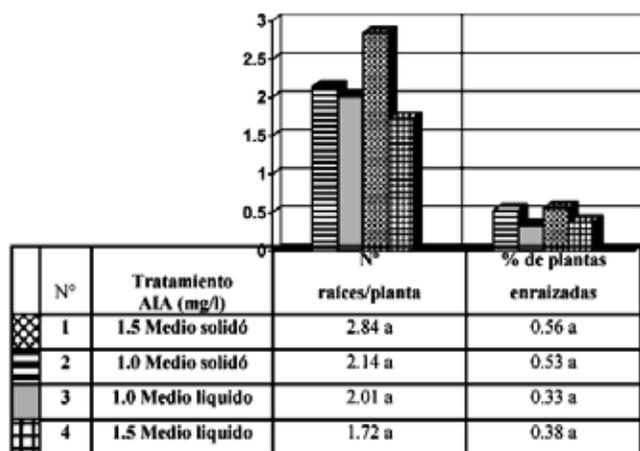


Figura 5. Efecto del Ácido indolacético en medio sólido y líquido sobre la formación de raíces.

cultivos para cada una de las fases (establecimiento, multiplicación y enraizamiento).

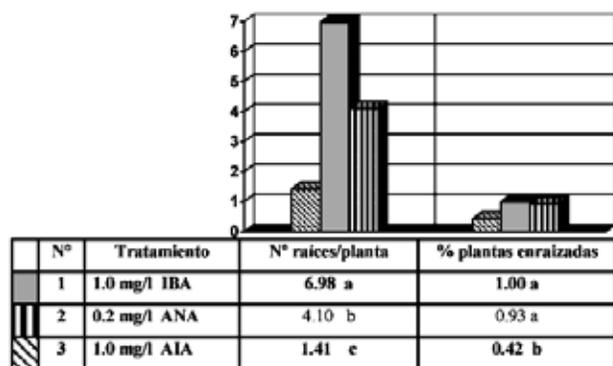


Figura 6. Efecto del Ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalen-acético sobre la formación de raíces.

Para establecer un sistema de propagación *in vitro* de tejidos vegetales, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante y al sistema de cultivo. La efectividad de un medio de cultivo depende tanto de los ingredientes básicos (minerales). Así como de azúcares y hormonas (Romberger y Tabor, 1971; Bending, 1974; Lorz *et al.*, 1983).

Para el éxito de la fase III de la Micropropagación (enraizamiento) generalmente se utilizan las auxinas, las cuales por su origen pueden ser naturales o sintéticas. De las auxinas "naturales", el ácido indolacético (AIA) es el compuesto de mayor utilización (Scout, 1984). Las auxinas se utilizan ampliamente en micropropagación y se incorporan al medio de cultivo para

promover el desarrollo de callos, de suspensiones celulares, de órganos (como meristemas, yemas) y para regular la morfogénesis (Cisne, 1988). En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/l, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/l (Roca y Mroginski, 1991).

Se sabe que las auxinas son un factor esencial en la proporción del crecimiento de las raíces, debido a que, en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementa su crecimiento. También es conocido que las raíces a las que se les ha inhibido el crecimiento por medio de la aplicación de inhibidores sintéticos o naturales pueden reanudar si se les aplica auxinas (Hurtado y Merino, 1994).

Al establecer microesquejes de mora bajo la influencia de AIA a concentraciones que van desde 0.5 a 2 mg/l, se observó una formación de raíces muy pobre y variable, a tal punto que en ninguno de los tratamientos en estudios se superó el 50 % de plantas enraizadas. Este comportamiento se reflejó de forma similar en los ensayos en donde se estudió el comportamiento del AIA a concentraciones de 1.5 y 1 mg/l, tanto en medio líquido como semisólido. En estos casos, siempre se mantuvieron los bajos porcentajes de formación de raíces y en ambos no hubo diferencias significativas entre tratamientos.

En caso contrario al AIA, la utilización de hormonas sintéticas presentó una mayor producción de raíces en el cultivo de mora de Castilla, donde el ácido naftalenacético (ANA) tuvo un 93 % de plantas enraizadas contrapuesto al AIA con un 43%.

Castro y Gaviria (1995), realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies de *Rubus* bajo la aplicación de ácido indolbutírico (IBA) en diferentes concentraciones, donde se encontró que en concentraciones de IBA entre 1 y 3 mg/l indujo un porcentaje de enraizamiento del 100%. Una respuesta similar a la anterior se obtuvo en el estudio con 1.0 mg/l de IBA lográndose obtener el mayor número de raíces y con un 100% de plantas enraizadas.

CONCLUSIONES

La introducción de variedades de mora a través de cultivo de tejidos vegetales es una forma, rápida y segura que se debe utilizar para introducir materiales de interés económico para productores de Nicaragua.

Los medios de cultivos con concentraciones de 2.5 mg/l BAP; 0.03 mg/l GA₃ indujeron los mejores resultados en cuanto a altura promedio de planta, número promedio de hojas, número promedio de nudos y número promedio de hijos. La mayor producción de raíces por planta y plantas enraizadas se obtuvo con ácido indolbutírico a concentraciones de 1.0 mg/l.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARDITTI, J.** 1966. The effect of tomato juice and its fractions on the germination of orchid seeds and on seedling growth. American Orchid Society Bulletin. 35 (3): 175-182.
- AZCON, TA.** 2000. Fundamento de fisiología vegetal. Universidad de Barcelona. España. 535 p.
- BENDING, H.** 1974. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von *Petunia hybrida*. L. Z. Pflanzenphysiol. 74: 327-356.
- CASTRO, RD. Y GAVIRIA, G: B.** 1995. Propagación *in vitro* de especies del género *Rubus* Universidad Católica de Oriente. Fundación de Fomento Agropecuario Buen Pastor. Serie: investigaciones-10. Colombia. 9p.
- CISNE, J.D.** 1988. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Tesis Ing. Agr. Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. 89 p.
- DURZAN, DJ. Y STEWARD, FC.** 1983. Nitrogen metabolism. En: Steward, F. C. y Bidwell, R. G. S. (eds). Plant physiology: Atretise. Academia Press, Nueva Cork. V. 8, P.55-265
- FRANCO, G; GIRALDO, M.** 1999. El cultivo de la mora. 2 ed. Feriva Corpoica. Comité Departamental de Cafeteros de Risalda. Colombia. 99 p.
- GARCÍA, F; MARTÍNEZ, B.** 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Ediciones Mundi Prensa. España. 219 p.
- HURTADO, DM; MERINO, ME.** 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas S.A. de C.V. México. 233 p.
- LÓPEZ BALTASAR, J. Y AVITIA GARCÍA.** 1991. *In vitro* propagation of four raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. Revista Chapingo 15. 155p.
- LORZ, H; LARKING, PJ; SCOW CROFT, WR.** 1983. Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2: 217-226.
- MARULANDA, M. L.** 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). Actual Biol 22 (73): 121-129.
- MONTOYA, CA; HINCAPIÉ, LA ; URIBE, V.** 1997. Principales enfermedades y plagas en el cultivo de mora. Boletín técnico, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Unidad de asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA). Quinchía. Pp 8-9.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F.** 1962. A revised medium, for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plantarum. 497p.
- NITSCH, JP; NITSCH, C.** 1957. Auxin dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues; 2: Organic nitrogenous compounds. Amer. J. Bot. 44: 550-564.
- NITSCH, JP.** 1954. Action du jus de tomate sur la croissance de certains tissus et organes vegetaux. Bull. Soc. Bot. France. 101: 433-440.
- REINERT, J; WHITE, PR.** 1956. The cultivation *in vitro* of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. Physiol. Plant. 9: 177-189.
- ROCA, WM; MROGINSKI LA.** 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. 170 p.
- ROJAS, G; RAMÍREZ, H.** 1991. Control hormonal del desarrollo de las plantas, fisiología-tecnología-experimentación. 2ª. ed. México. Limusa. 56p.
- ROMBERGER, JA; TABOR, CA.** 1971. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture: Aguar and autoclaving effects. Ame. J. Bot. 58: 131-140.
- SALDIVAR LHR.** 1994. Fisiología Vegetal. ed. 1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. Editorial Trillas. México. 23 p.
- SÁNCHEZ, G;** 2004. Tratan de salvar potencial de la mora. El Nuevo Diario, Managua, Nic, May. 19:9c.
- SCOUT, TK.** (ed.) 1984. Hormonal regulation of development; 2: The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. Encyclopedic of plant physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva Cork. V. 10.
- VACIN, EF; WENT, FW.** 1949. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. Botan. Gaz. 111: 175-183.
- VAN BRAGA, J; PIERIK, RLM.** 1971. The effect of autoclaving on the gibberellin activity of aqueous solutions containing gibberellin A₃. Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen. 9: 1-147.