

REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) Y SU COMPORTAMIENTO EN CONDICIONES NATURALES

Amelia Capote Rodríguez, Ailé de la Caridad Vicente, Odalys Pérez Díaz y Gloria Acuña

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). acapote@inifat.co.cu

RESUMEN

Se evaluó el efecto de reguladores del crecimiento (2,4 D, BAP, KIN y Biobras 16) en la regeneración de plántulas provenientes de embriones inmaduros de diferentes genotipos y el efecto de bioestimuladores (AZOMEG, FITOMAS y ENERPLANT), solos o combinados, en la fase de adaptación a condiciones naturales de las vitroplantas regeneradas. Los caracteres morfoagronómicos de las plantas obtenidas se estudiaron con vistas a evaluar el potencial de variación somaclonal y determinar los caracteres de mayor contribución a la misma. Los resultados obtenidos muestran que los mayores porcentajes de regeneración de embriones *in vitro* (100%) y altura de las plántulas (19-22 cm) se obtuvieron en el medio MS sin suministro hormonal, con independencia del genotipo evaluado. La aplicación de una mezcla de FITOMAS y AZOMEG (50%) en el momento del transplante de las vitroplantas de maíz cv. ‘P 315’ estimuló los porcentajes de supervivencia (80%) y la altura de las plantas (24,5 cm) a los 15 días posterior al transplante. La caracterización morfoagronómica de las plantas obtenidas en condiciones de campo permitió agrupar los individuos en cuatro grupos según su comportamiento, así como determinar los caracteres de mayor contribución a la variabilidad obtenida.

Palabras clave: bioproductos, maíz, variación somaclonal.

PLANT REGENERATION FROM IMMATURE MAIZE (*Zea mays* L.) EMBRYOS AND ITS BEHAVIOUR UNDER NATURAL CONDITIONS

ABSTRACT

Effect of growth regulator (2,4 D, BAP, KIN y Biobras 16) on plant regeneration from immature embryos of different genotypes of maize and the effect of bioproducts (AZOMEG, FITOMAS y ENERPLANT) during their acclimatization was evaluated and to know the potential of somaclonal variability were studied the morphoagronomic characters. The higher percentage of *in vitro* embryo regenerated was obtained on MS medium without hormonal supplement. Application together of FITOMAS and AZOMEG (50%) on plants cv. ‘P 315’ increases the percentage of survive (80%) and the height of plants (24,5 cm). Morphological characterization separated the plants in four groups and selected the characters of higher contribution to genetic variability.

KEY WORDS: bioproducts, maize, somaclonal variation.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) conjuntamente con el arroz y el trigo, es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana y animal. En este cultivo, los métodos tradicionales de fitomejoramiento, tales como el uso de introducciones, hibridación y selección han sido exitosos en el desarrollo de nuevas variedades de maíz. Sin embargo; a mediados de los años ochenta se incentivó el uso del cultivo de tejidos en

los programas de investigación del maíz, los cuales han contribuido sustancialmente al mejoramiento y liberación temprana de nuevas variedades (Lentini, 2000).

Dentro de las técnicas *in vitro*, el cultivo de embriones se ha utilizado para diferentes propósitos, como estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos, producir monoploides y superar la latencia de las semillas (Litz, 1991).

En el caso específico del maíz, el cultivo de embriones inmaduros se ha empleado en la obtención de callos embriogénicos (Duncan *et al.*, 1995), la transformación genética (Murry *et al.*, 1989; Ishida *et al.*, 1996) y el rescate de embriones con el objetivo de incrementar la frecuencia de hibridación (Lentini, 2000).

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la germinación y el desarrollo de embriones inmaduros de maíz, la adaptación de las vitroplantas a condiciones naturales y el potencial de variación somaclonal obtenido.

MATERIALES Y METODOS

Germinación y crecimiento *in vitro* de embriones inmaduros de maíz.

Los granos inmaduros procedentes de mazorcas del genotipo 'P 315' cosechadas en condiciones de campo en la Finca "Amalia" ubicada en el Municipio Boyeros, se desinfectaron superficialmente con alcohol (70%) durante 3 minutos, seguido de inmersión en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 2% durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril tres veces.

En condiciones asépticas se aislaron los embriones inmaduros (estado cotiledonar) y se sembraron en un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1 mg.L⁻¹ de uno de los siguientes reguladores del crecimiento, ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), 6- bencil amino purina (BAP) y 6- furfuril amino purina (KIN) y un control sin suplemento hormonal (tabla 1).

El pH de los medios se ajustó en todos los casos a 5,7 previo a la adición de agar (7 g.L⁻¹) y los mismos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El cultivo se realizó en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 14 horas luz y una temperatura de 25 ± 2°C.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de maíz.

Tratamientos	Medios de cultivo
I	MS (sin suplemento hormonal)
II	MS + 1mg.L ⁻¹ 2,4- dicloro fenoxi acético (2,4-D)
III	MS + 1mg.L ⁻¹ 6- bencil amino purina (BAP)
IV	MS + 1mg.L ⁻¹ 6- furfuril amino Purina (KIN)

A los 30 días de cultivo se evaluaron los porcentajes de callos formados o plántulas desarrolladas y la altura de las plántulas obtenidas. Para corroborar los resultados obtenidos, el medio de mejor respuesta (MS sin suplemento) se utilizó para evaluar el comportamiento de otros genotipos. Para ello se estudiaron diferentes genotipos (tabla 2) y se evaluaron las variables antes señaladas.

Tabla 2. Genotipos utilizados en los estudios de germinación *in vitro* de embriones inmaduros de maíz.

Número	Genotipos
1	P 315
2	P 677
3	P 433
4	P 530
5	P 280
6	P 216

En todos los casos los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA de clasificación simple y las diferencias significativas determinadas mediante una prueba de Neuman-Keuls 5%.

Adaptación de las vitroplantas a condiciones *ex vitro*.

Las vitroplantas del genotipo 'P 315' obtenidas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin suplemento de reguladores del crecimiento se transfirieron a macetas con un sustrato compuesto por suelo (ferralítico rojo) y materia orgánica (1:1) y se colocaron en condiciones controladas (túneles). Se adicionaron diferentes bioestimuladores del crecimiento (Azomeg, Fitomas E y Enerplant) solos o combinados (Tabla 3) con el objetivo de determinar el efecto de su aplicación sobre los porcentajes de supervivencia en la fase de aclimatación.

Se plantaron dos plantas/maceta y un total de 10 macetas/tratamiento estudiado. A los 15 días se determinó el porcentaje de supervivencia obtenido. Por otra parte, con el objetivo de determinar el posible efecto que sobre el crecimiento de las plantas pueden tener los bioestimuladores empleados se midieron, en 10 plantas de cada tratamiento, las variables altura de las plantas (cm), número de hojas emitidas y diámetro del tallo (mm) a los 7 y 21 días de trasplante.

Tabla 3. Tratamientos utilizados para evaluar los porcentajes de supervivencia de las vitroplantas durante la fase de aclimatación.

	Tratamientos
1	Control (agua destilada)
2	FITOMAS E (0,1 mL.L ⁻¹)
3	AZOMEG (1,0 mL.L ⁻¹)
4	ENERPLANT (0,1 g.L ⁻¹)
5	FITOMAS- AZOMEG
6	FITOMAS- ENERPLANT
7	FITOMAS- AZOMEG- ENERPLANT
8	Semillas (Control)

Estudio de la variabilidad observada en plantas de maíz cv. 'P 315', crecidas en condiciones de campo.

Las macetas con las vitroplantas adaptadas del genotipo 'P 315' se colocaron en condiciones de campo abierto para que continuaran su crecimiento y desarrollo hasta alcanzar la fase de floración y fructificación. Se considero cada planta una unidad experimental.

Con los objetivos de evaluar el potencial de variación somaclonal para su utilización en el mejoramiento genético de la especie y determinar los caracteres que mayor

frecuencia de variación muestran se realizó una caracterización morfoagronómica de las vitroplantas en estudio (Tabla 4), atendiendo a los descriptores tanto cualitativos como cuantitativos de la especie.

Tabla 4. Relación de caracteres agromorfológicos a evaluar en las vitroplantas obtenidas.

Número	Siglas	Caracteres evaluados	
1	AP	Altura de la planta	cm
2	AM	Altura de la mazorca	cm
3	NMP	Número de mazorcas por planta	
4	LE	Longitud de la espiga	cm
5	CT	Color del tallo	Verde (1), Morado (4), Otro (6)
6	NHT	Número de hojas totales	
7	LM	Longitud de la mazorca	cm
8	DM	Diámetro de la mazorca	Cm
9	FM	Forma de la mazorca	Cilíndrica (1), Cilíndrica-cónica (2), Cónica (3)
10	NHG	Número de hileras con granos	
11	DH	Distribución de las hileras	Irregular (2), Recta (3), En espiral (4)
12	TG	Tipo de grano	Dentado (3), Semi-dentado (4) Semi-cristalino (5), Cristalino (6)
13	CG	Color del grano	Blanco (1), Amarillo (2)
14	CDG	Color dorsal del grano	Blanco (1), Amarillo (4)
15	CE	Color del endospermo	Blanco (1), Amarillo (4), Anaranjado (5)
16	FSG	Forma de la superficie del grano	Contraído (1), Dentado (2) Plano (3), Redondo (4)
17	LG	Largo del grano	cm
18	EG	Espesor del grano	cm
19	AG	Ancho del grano	cm
20	DT	Diámetro de la tusa	cm
21	P100S	Peso de 100 semillas	g

Con los resultados obtenidos se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) donde se seleccionaron los autovalores con valores iguales o superiores a 0,35 en los ejes principales. Posteriormente se realizó un Análisis de Conglomerados por el método de Ward, a partir de una matriz de Distancia Euclidiana.

Para cada grupo identificado se calcularon los estadígrafos de dispersión y de variación más importantes en los caracteres cuantitativos. En el caso de los caracteres cualitativos se determinó la frecuencia de variación de los mismos para determinar cuáles fueron más susceptibles a sufrir variaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación y crecimiento *in vitro* de embriones inmaduros de maíz

En la figura 1 se muestra los porcentajes de formación de callos (a) y desarrollo de plántulas (b) en los medios de cultivos estudiados. Se observó que en los medios suplementados con reguladores del crecimiento se obtuvieron altos porcentajes de formación de callos, siendo mayor la respuesta en el medio suplementado con 2,4-D (25%); sin embargo en el medio sin suplemento (control) no se observó la proliferación de callos y el 100% de los embriones cultivados desarrollaron plántulas.

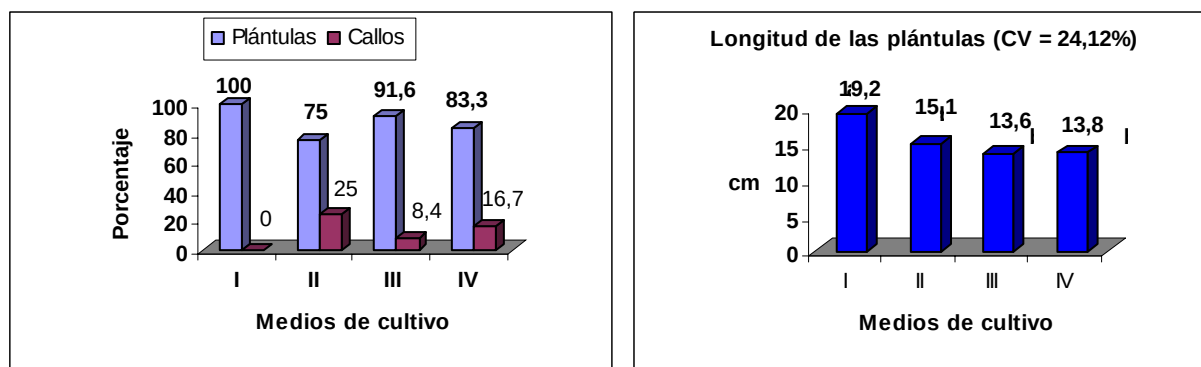


Figura 1. Porcentajes de formación de callos (a) y crecimiento de plántulas (b) a partir de embriones inmaduros de maíz cv. 'P 315' crecidas en los medios de cultivo empleados.

(I: MS (sin suplemento hormonal), II: MS + 1mg.L⁻¹ 2,4- dicloro fenoxi acético (2,4-D), III: MS + 1mg.L⁻¹ 6- bencil amino purina (BAP), IV: MS + 1mg.L⁻¹ 6- furfuril amino Purina (KIN))

En cuanto a la variable altura de las plántulas obtenidas se observan diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados. La máxima altura de las plántulas (19,2 cm) se obtuvo en el medio I (control), valor que difiere significativamente del resto de los medios empleados.

Estos resultados posibilitan seleccionar el medio I para el crecimiento de plántulas a partir de embriones inmaduros de maíz, por lo que cuando se evaluó el comportamiento de diferentes genotipos en este medio de cultivo (tratamiento I) se observó que el 100% de los embriones cultivados desarrollaron plantas independientemente del genotipo estudiado, sin formación de callos y la variable altura de las plántulas no mostró diferencias significativas entre ellos (Figura 2).

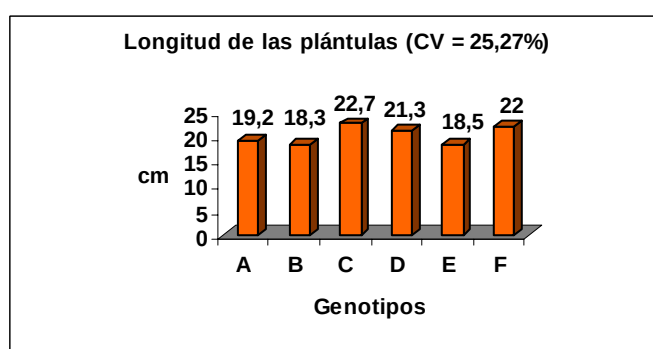


Figura 2. Comportamiento de la variable altura de las plántulas en los diferentes genotipos estudiados (a) y vitroplantas del cv. 'Pajimaca' crecidas en medio MS sin suplemento hormonal (b).

Adaptación de las vitroplantas a condiciones ex vitro.

En la figura 3 se observan los porcentajes de supervivencia de las vitroplantas a los 15 días del trasplante.

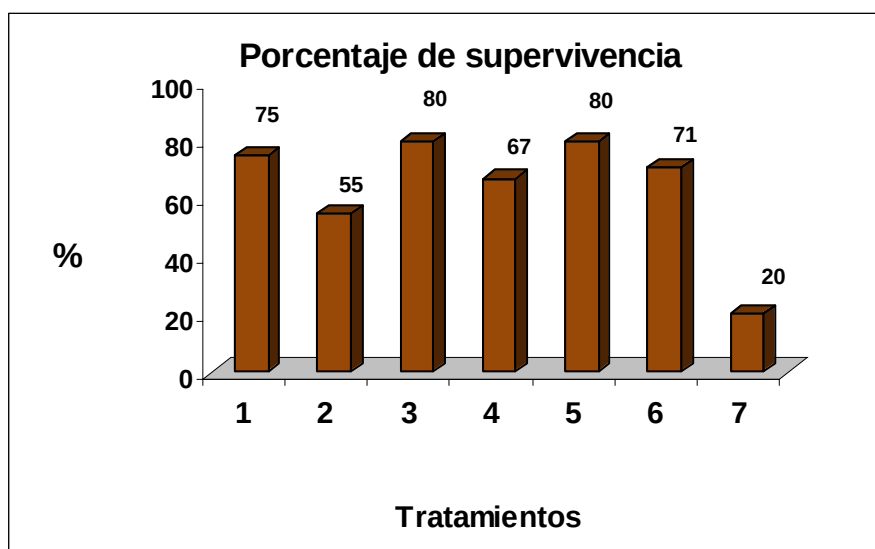


Figura 3. Porcentajes de supervivencia de vitroplantas de maíz cv. 'P 315' obtenidos a los 15 días de trasplante, en dependencia de los tratamientos estudiados.

Los tratamientos 3 (Azomeg) y 5 (Fitomas E + Azomeg) estimularon los porcentajes de supervivencia en un 5% con respecto al control (agua) alcanzando el 80% de supervivencia de las plantas.

El biopreparado AZOMEG, obtenido a base de las bacterias *Azotobacter chroococum* (cepa INIFAT-12) y *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* (cepa INIFAT Bm1), suministra a las plantas cantidades de nitrógeno y fósforo que oscilan entre 15 y 50% de las necesidades de los vegetales (Dibut, 2005). Este efecto se debe a la doble función de fijar el dinitrógeno y solubilizar el fósforo no soluble presente en el suelo, además del aporte de ambas bacterias en la biosíntesis de PGPRs que se traduce en una estimulación del crecimiento y desarrollo de órganos y tejidos.

Igualmente efectiva es la aplicación del biofertilizante Azomeg en combinación con el bioproducto Fitomas E, resultados que coinciden con otros autores quienes plantean que el efecto de los microorganismos biofertilizadores se potencia cuando se combinan con otros productos naturales (Arozarena *et al.*, 2004 y Terry *et al.*, 2007).

Por su parte, el Fitomas E es un bioestimulante derivado de la industria azucarera obtenido y desarrollado por el ICIDCA, que ejerce una gran influencia en el desarrollo de las plantas dado por su poderoso efecto antiestrés, el cual se ha demostrado en casos de sequía, exceso de humedad, desequilibrios nutricionales y salinidad. Está constituido, por aminoácidos, bases nitrogenadas y péptidos de origen vegetal y actúa en los centros activos y en los procesos bioquímicos de las plantas (Montano y Villar, 2005) y en estudios anteriores se plantea su uso como un bioestimulante para la obtención de posturas de café con resultados satisfactorios (Alvarado *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en las variables evaluadas, altura de las plantas (a), número de hojas (b) y diámetro del tallo (c) a los 7 y 21 días de cultivo se muestran en la figura 4.

Los resultados obtenidos muestran que no existieron diferencias significativas en las variables altura de las plantas y número de hojas, donde se observan resultados similares en todos los tratamientos estudiados, lo que indica que los mismos no tuvieron influencia en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, para el diámetro del

tallo se observan diferencias significativas, siendo los tratamientos control (1), Enerplant (4) y Fitomas E- Enerplant (6) los que mostraron los menores valores (8 y 9 mm).

El Enerplant es un producto biológico que se obtiene a partir de materiales vegetales mediante procesos de extracción. Este bioestimulador, al emplearse en dosis muy pequeñas, actúa como precursor y catalizador de niveles óptimos de hormonas, enzimas y cofactores, de cuya acción depende el desarrollo balanceado de la planta, una producción con mayor vigor y es capaz de reducir el estrés ambiental e incrementar los rendimientos. Se ha empleado como bioestimulante foliar en plántulas de tabaco (Rodríguez, Y. *et al.*, 2006) y pepino (Rodríguez, P. *et al.*, 2006).

La fase de aclimatación de vitroplantas requiere especial atención ya que los porcentajes de supervivencia obtenidos suelen ser muy bajos en algunas especies, por lo que en ocasiones se emplean sustancias bioactivas, tal es el caso del Enerplant en vitroplantas de piña (Chea *et al.*, 2004) y análogos de brasinoesteroides en vitroplantas de banano (Izquierdo *et al.*, 2004).

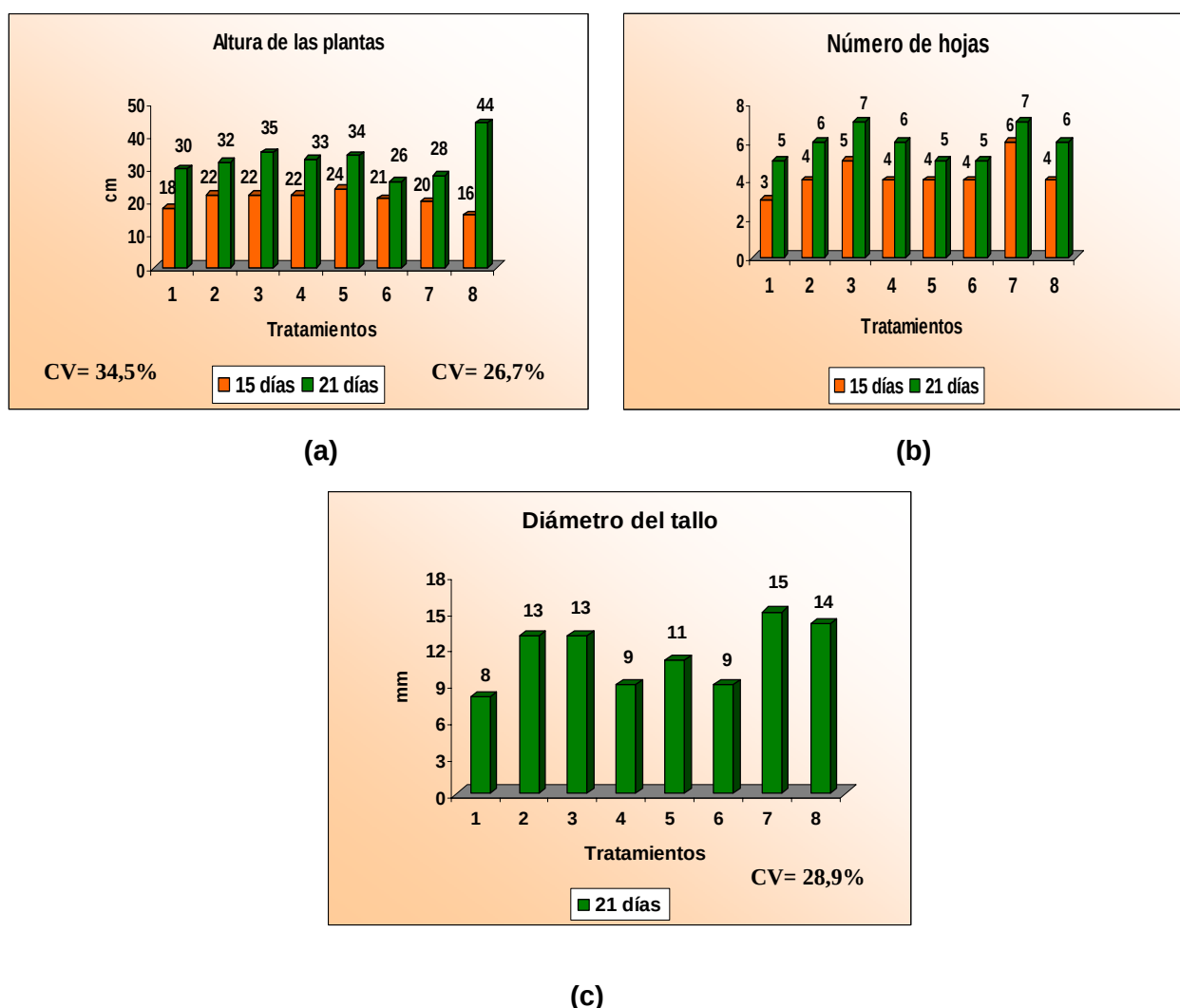


Figura 4. Respuestas de las variables evaluadas, altura de las plantas (a), número de hojas (b) y diámetro del tallo (c) según los tratamientos aplicados.

Estudio de la variabilidad observada en plantas de maíz cv. 'P 315', crecidas en condiciones de campo.

El ACP realizado permitió constatar que las 4 primeras componentes extrajeron el 59,66% de la variación total obtenida (Tabla 5).

Las variables que más contribuyeron a la variabilidad de forma positiva fueron: Número de hileras con granos (NHG), Diámetro de la mazorca (DM), Diámetro de la tusa (DT), Longitud de la espiga (LE), Longitud de la mazorca (LM) y Peso de 100 semillas (P100S), mientras que las variables cualitativas: Forma de la superficie del grano (FSG), Espesor del grano (EG), Tipo de grano (TG) y Distribución de las hileras (DH) mostraron una contribución alta y negativa.

Tabla 5. Resultados del ACP realizado con los resultados de las evaluaciones agromorfológicas realizadas.

	Componentes			
	C1	C2	C3	C4
Varianza	4.61	3.22	2.62	2.07
% de contribución	21.97	15.34	12.49	9.86
% acumulado	21.97	37.31	49.80	59.66
Contribución relativa de las variables originales				
AP	0.28	-0.17	0.05	-0.19
AM	0.32	-0.26	-0.05	0.0005
NMP	-0.18	0.10	0.25	0.16
LE	-0.22	-0.12	0.05	0.39
CT	0.26	-0.29	0.09	0.14
NHT	0.27	-0.04	0.22	-0.13
LM	0.14	0.06	-0.29	0.45
DM	0.23	0.21	0.42	0.01
FM	-0.29	-0.02	0.23	-0.12
NHG	0.29	0.35	-0.03	0.04
DH	0.005	-0.03	-0.16	-0.47
TG	-0.01	-0.34	-0.37	-0.12
CG	0.01	-0.06	0.001	0.23
CDG	-0.03	0.18	-0.20	0.08
CE	0.19	-0.16	0.0002	0.0001
FSG	-0.07	-0.44	-0.001	0.02
LG	0.32	-0.05	0.04	0.19
EG	-0.23	-0.38	0.17	-0.06
AG	0.27	-0.17	-0.04	0.16
DT	0.11	-0.08	0.50	-0.10
P100S	-0.16	-0.16	0.21	0.35

En la figura 5 se observa la distribución de las variables evaluadas en el plano formado por las componentes C1-C2

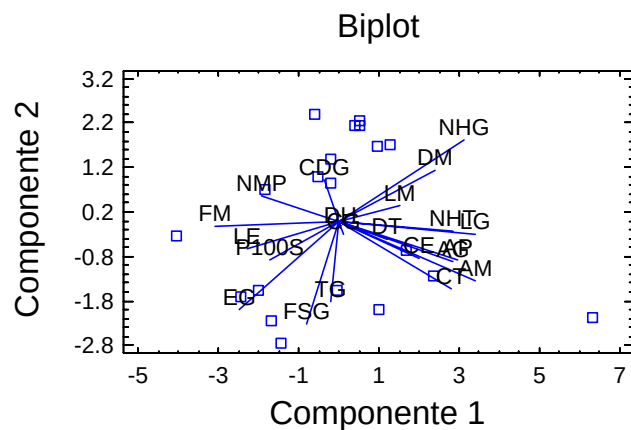


Figura 5. Representación gráfica de la dispersión de las variables evaluadas.

El dendrograma obtenido (figura 6) con los autovectores seleccionados mostró que las vitroplantas se agruparon en 4 grupos, el Grupo I con un total de 4 materiales (20%), el Grupo II con 8 (40%), el Grupo III con 3 (15%) y el Grupo IV con 5 materiales (25%).

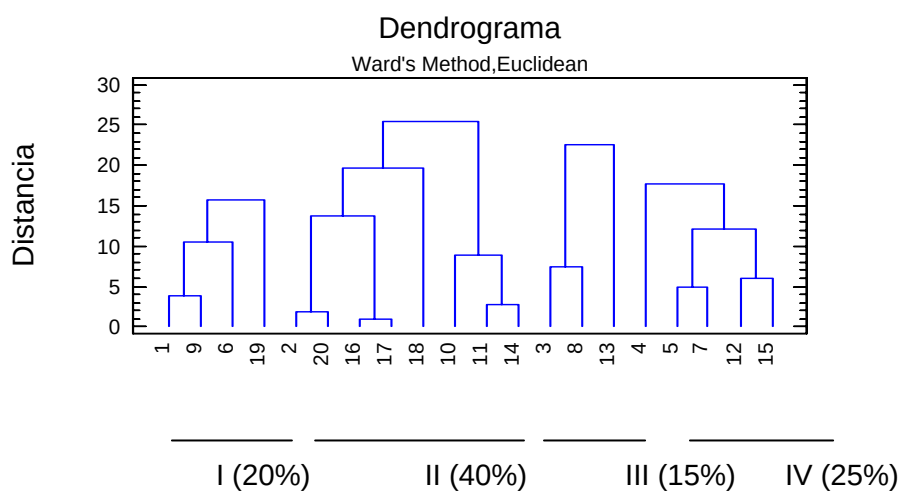


Figura 6. Resultados de la agrupación según los tratamientos estudiados.

La tabla 6 muestra los estadígrafos de dispersión y variación de los caracteres cuantitativos evaluados según la clasificación de los grupos formados.

Tabla 6. Estadígrafos principales de los caracteres cuantitativos evaluados por grupos formados.

Grupos	Estadígrafos	Caracteres cuantitativos						
		DM	NHG	LE	EG	DT	LM	P100S
I	Media	3,3	6,5	38,0	0,8	2,57	4,5	27,82
	DS	0,54	4,12	4,08	0,11	0,35	0,40	6,89
	CV	0,16	0,63	0,10	0,14	0,13	0,09	0,24
II	Media	3,72	15,0	38,5	0,4	2,42	12,12	14,87
	DS	0,26	2,58	4,79	0	0,17	1,65	2,83
	CV	0,07	0,17	0,12	0	0,07	0,13	0,19
III	Media	3,0	8,66	49,33	0,66	2,13	16,0	33,83
	DS	0,72	1,15	2,30	0,20	0,47	0,86	6,61
	CV	0,24	0,13	0,04	0,31	0,22	0,05	0,19
IV	Media	4,27	13,0	40,5	0,52	2,5	8,0	30,27
	DS	0,15	1,15	2,08	0,12	0,28	2,16	6,58
	CV	0,03	0,08	0,05	0,23	0,11	0,27	0,21

El Grupo I se caracteriza por mostrar los valores mayores de EG (0,8 cm), el Grupo III de LE (49,3 cm), LM (16) y P100S (33,83 g) y el grupo IV de DM (4,2 cm) y NHG (13). En este grupo están incluidas las plantas control (1) obtenidas a partir de semillas del cv. 'P 315'.

La figura 7 muestra la frecuencia de variación de los caracteres cualitativos evaluados. Los mayores porcentajes de variación se obtuvieron en los caracteres Color del tallo (61%) y Tipo de grano (72%), mientras que el carácter Color del grano se comportó como el más estable (6% de variación).

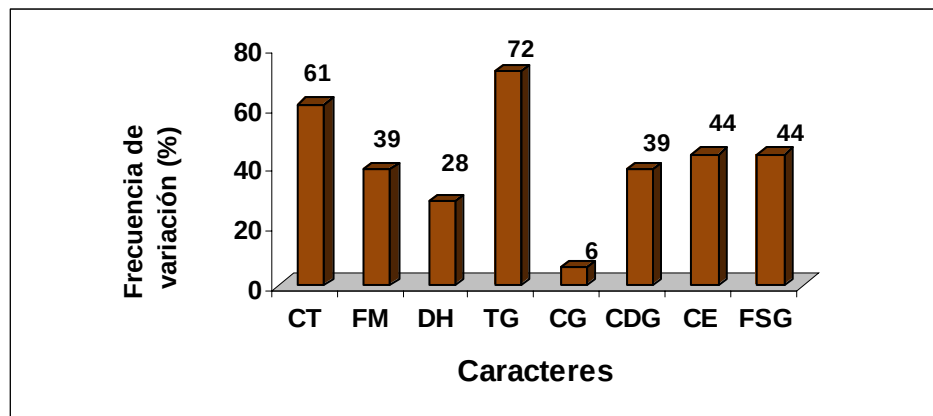


Figura 7. Frecuencia de variación en los caracteres cualitativos evaluados.

La figura 9 muestra las variaciones obtenidas en los caracteres cualitativos de mayor variabilidad y los porcentajes obtenidos. El carácter Tipo de grano es el que mostró mayor variabilidad, presentando una gama amplia de tipos de grano, encontrándose desde cristalino (10%) y dentado (35%) hasta tipos intermedios (55%).

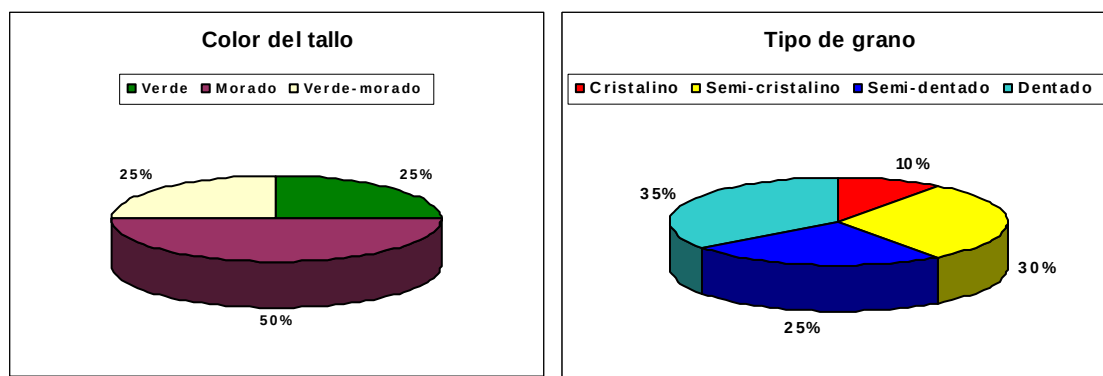


Figura 9. Porcentajes de variación en los caracteres cualitativos de mayor variabilidad.

El cultivo de tejidos es una técnica mutagénica que se utiliza hoy en día de una manera extensiva en los procedimientos de transformación y propagación de plantas de maíz, por lo que se han estudiado las bases moleculares de las variantes genéticas que se producen y se plantea que ocurren cambios como principales respuestas al estrés impuesto dadas las condiciones de cultivo, tales como la sustitución de bases, la metilación del ADN, la inserción de transposones, la recombinación somática y la replicación tardía de la heterocromatina (Dávila y Kaeppler, 2000).

En este sentido estos autores trabajaron para encontrar las bases moleculares para la expresión diferencial del color de la mazorca en líneas de maíz obtenidas *in vitro*, a partir de la autopolinización de plantas identificadas como mutantes y sus resultados sugieren un aumento de la metilación de las mismas.

Los resultados obtenidos muestran que es posible obtener variaciones en las plantas regeneradas *in vitro* a partir de embriones inmaduros de maíz, las cuales deben ser estudiadas en posteriores generaciones para evaluar la estabilidad de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, K., Blanco, E., Samon, A. y Villar, J. (2006): Influencia de un bioestimulante cubano en la obtención de posturas de café. Resúmenes y memorias del XV Congreso Científico INCA, nov. 7 al 10, 2006, pág. 158.
- Arozarena, N. 2004
- Chea, A., Valera, E. e Isidró, M. (2004): Influencia de diferentes sustratos y bioproductos en la fase de aclimatación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Resúmenes y memorias del XIV Congreso Científico INCA, nov. 9 al 12, 2004, pág. 107.
- Davila, M. y Kaeppler, S., (2000): Análisis molecular de mutaciones inducidas por cultivo de tejidos en maíz. *Agronomía Tropical*, 50 (1): 61-66.
- Dibut A (2005): Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible. Cosio Eds., Sinaloa, México. 115 pp.
- Duncan DR, Williams ME, Zehr BE y Widholm JM (1985): The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta*, 165: 322-332
- Ishida Y, Saito H, Otha S, Hei Y, Kmari T y Kumashiro T (1996): High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14 (6): 745- 750.
- Lentini Z (2000): Mejoramiento genético y biotecnología. Biotecnología en el fitomejoramiento del maíz. En: El maíz en Venezuela. Fundación Polar. ISBN 980-379-004-8.

- Litz RE (1991): Cultivo de embriones y óvulos. En: Cultivos de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. (W.M. Roca y L.A. Mroginski, eds). CIAT, 295 - 312.
- Murashige T and Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473- 497.
- Murray LE, Johnson J y Nichols S (1989): Transient expression of β - glucoronidase in electrotransformed corn embryos. *Am. J. Bot.*, 77: 151a.
- Rodríguez, Y., Franganillo, D. y Cabrera, M. (2006): Efecto del bioestimulador Enerplant sobre algunas características morfológicas del tabaco. Resúmenes y memorias del XV Congreso Científico INCA, nov. 7 al 10, 2006, pág. 99.
- Rodríguez, P., Pérez, A. y Castillo, J. (2006): Los bioestimulantes foliares y su impacto en algunos indicadores del crecimiento y la productividad del pepino híbrido 'Sarig HA 454' en casa de cultivo tecnificada. Resúmenes y memorias del XV Congreso Científico INCA, nov. 7 al 10, 2006, pág. 161.