

## Empleo del BIOBRAS-6 en la micropropagación del cultivar de plátano FHIA-21 (AAAB)

Felipe Alberto Jiménez Terry\*, Daymí Ramírez Aguilar, Daniel Agramonte Peñalver. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara Villa Clara. Cuba.

### RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la efectividad del BIOBRAS-6 en la micropropagación del cultivar de plátano FHIA-21(AAAB) se llevó a cabo el presente trabajo durante el período de enero del 2000 a septiembre del 2001, en el laboratorio de Propagación Masiva, del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Se estudiaron diferentes concentraciones (0.05 y 0.01 mg.l<sup>-1</sup>) y combinaciones de este producto con reguladores del crecimiento para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* y la aclimatización. Los resultados mostraron un marcado efecto de reforzamiento auxínico del BIOBRAS-6 para las diferentes etapas. En la fase de multiplicación el BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) combinado con 6-Benzilaminopurina (6BAP) (4 mg.l<sup>-1</sup>) presentó los indicadores superiores del crecimiento de las plantas *in vitro*, al igual que en la fase de enraizamiento como suplemento del medio de cultivo con Acido indolacético (AIA) 0.65 mg.l<sup>-1</sup>. También se observó un desarrollo superior de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización después de la inmersión de las raíces en la solución de agua común con BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y Acido naftalenacético (ANA) (10 mg.l<sup>-1</sup>). De forma general el empleo del BIOBRAS-6 en la micropropagación del cultivar híbrido FHIA-21 incrementó los principales indicadores del crecimiento para las diferentes etapas.

Palabras clave: brasinoesteroide, calidad, plantas *in vitro*, reforzamiento auxínico

### ABSTRACT

With the objective of evaluating the effectiveness of BIOBRAS-6 in the micropropagation of the plantain cultivar FHIA-21, the present work was carried out during the period of January 2000 to September 2001, in the laboratory of Mass Propagation of the Institute of Plant Biotechnology. Different concentrations (0.05, 0.01 mg.l<sup>-1</sup>) and combinations of this product were studied with growth regulators for multiplication, *in vitro* rooting and acclimatization. Results obtained in the experiments of the different phases had a marked effect of auxin reinforcement of BIOBRAS-6. In the multiplication phase BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) combined with 6-Benzilaminopurine(BAP) (4 mg.l<sup>-1</sup>) presented growth indicators superior to the plants *in vitro* as well as in the rooting phase as supplement of the culture medium with Indolacetic acid(IAA) (0.65 mg.l<sup>-1</sup>). A superior development was also observed in the *in vitro* plants in the acclimatization phase after submerging the roots in a solution of water with Naftalenacetic acid (NAA) (10 mg.l<sup>-1</sup>) and BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>). In general the use of BIOBRAS-6 in the micropropagation of the hybrid FHIA-21, increased the principal indicators for the different stages.

Key words: brasinosteroids, quality, *in vitro* plants, auxin reinforcement

### INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) son una importante fuente alimenticia en las regiones productoras de América Tropical. Y constituyen a nivel mundial el principal alimento para cerca de 400 millones de personas, con una producción anual de 76 millones de toneladas. Aproximadamente el 50% de la producción de bananos se consume dentro de los países productores y el resto se exporta, mientras que el plátano se emplea en su totalidad como alimento básico (Bermúdez *et al.*, 2000). La micropropagación de los plátanos y en particular del híbrido FHIA-21, presenta algunos problemas que afectan negativamente su tasa de multiplicación y brotación incluyendo brotación reducida, ocurrencia de alta oxidación de los explantes y crecimiento lento. El empleo del brasinoesteroide BIOBRAS-6 en especies cultivadas *in vitro* abre nuevas posibilidades ya que el mismo pudiera sustituir a algunos

reguladores del crecimiento empleados en los medios de cultivo. Con el objetivo de evaluar el efecto de este Brasinoesteroide sobre el coeficiente de multiplicación y el incremento de la calidad de las plantas *in vitro* del cultivar FHIA-21 en la micropropagación se realizó el presente trabajo.

### MATERIALES Y METODOS

En los ensayos realizados en el Instituto de Biotecnología de Las Plantas (IBP), ubicado en la Universidad Central de las Villas, se utilizaron plantas *in vitro* del cultivar de plátano híbrido FHIA-21 (AAAB), procedentes de un tercer subcultivo. El instrumental utilizado se esterilizó en la estufa a 180°C y los medios de cultivo en autoclave a una temperatura de 121°C y 1.2 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 minutos. El material vegetal se colocó en cámaras de luz solar (4 500 lux) con temperatura constante de 28± 2°C. Las vitroplantas en la fase de aclimatización se

colocaron en cajas de polieturano de 70 alvéolos con 121 cm<sup>3</sup> de volumen cada uno. En la etapa de multiplicación el medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962) + 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina + 3% sacarosa y 8% de agar, dosificado a razón de 30 ml/frasco con 10 explantes y 10 réplicas por tratamiento. En las variantes de medios de cultivo líquidos se redujeron las sales (MS) al 70% y se aplicaron 15 ml de medio por frasco. Se utilizaron frascos de 250 ml de capacidad. Se realizaron tres subcultivos o evaluaciones en esta etapa, cada 21 días y el manejo utilizado fue: separación de brotes axilares, extracción de los tejidos fenolizados y corte transversal en el cormo de las plantas completamente formadas. Para la fase de enraizamiento se incrementó a 4% de sacarosa el medio de cultivo de la fase de

multiplicación y la evaluación se efectuó a los 28 días. Las aplicaciones en la fase de aclimatización consistieron en la inmersión de las raíces de las plantas *in vitro* en las diferentes soluciones del Brasinoesteroide y el Acido Naftalenacético (ANA) con agua común durante 10 minutos antes de la plantación.

### Efecto del BIOBRAS-6 en la fase de multiplicación del FHIA-21

Se realizaron dos experimentos en la fase de multiplicación, para los estados físicos semisólido y líquido, en ambos se evaluaron diferentes combinaciones de 6-BAP (2.0 y 4.0 mg.l<sup>-1</sup>) y de BIOBRAS-6 (0.01 y 0.05 mg.l<sup>-1</sup>), además se compararon con un tratamiento control (4 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP + 0.65 mg.l<sup>-1</sup> de AIA (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos para la evaluación del efecto del BIOBRAS-6 en los medios de cultivo semisólido y líquido para la fase de multiplicación del FHIA-21.

Tratamientos	6- BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	BIOBRAS-6 (mg.l <sup>-1</sup> )	AIA (mg.l <sup>-1</sup> )
1	0	0.01	-
2	0	0.05	-
3	2	0.01	-
4	2	0.05	-
5	4	0.01	-
6	4	0.05	-
7 (control)	4	-	0.65

Las variables evaluadas en los subcultivos para la fase de Multiplicación *in vitro* fueron:

- Número de brotes, coeficiente de multiplicación y número de raíces y altura de las plantas.
- Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza trifactorial y análisis de varianza de clasificación simple con prueba de rango múltiple de Duncan para el 5%.

### Influencia del BIOBRAS-6 en el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* de FHIA-21 en la fase de enraizamiento

Con el objetivo de analizar la influencia del BIOBRAS-6 y combinaciones del mismo con AIA en el crecimiento y desarrollo de las plantas para la fase de enraizamiento, se definieron los siguientes tratamientos (Tabla 2.)

Las variables evaluadas en esta etapa, a los 28 días, fueron:

- Porcentaje de brotación de los explantes, número de raíces y altura de las plantas (cm), número de hojas, peso fresco y peso seco de la planta (g).
- Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza bifactorial y análisis de varianza de clasificación doble con prueba de rango múltiple de Duncan para el 5 %.

### Evaluación del comportamiento de las plantas *in vitro* del cultivar FHIA-21 en la fase de aclimatización

Para evaluar el comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización, se tomaron plantas *in vitro* procedentes de la fase de enraizamiento, las mismas crecieron en medio de cultivo con BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y AIA (0.65 mg.l<sup>-1</sup>) y se aplicaron los siguientes tratamientos a las plantas. Los mismos comprendieron la inmersión de las raíces en soluciones estimuladoras con los productos como se describe:

- 1- BIOBRAS-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>)
- 2- BIOBRAS-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>) + ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>)
- 3- BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>)
- 4- BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) + ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>)
- 5- ANA 10 mg.l<sup>-1</sup>)
- 6- Control (agua común)

Las variables analizadas en esta etapa fueron:

- Porcentaje de supervivencia (a los a los 15 días de plantadas las vitroplantas).
- salida del cepellón, altura de las plantas (cm), número de hojas y peso fresco y peso seco de la planta (g) (a los 45 días del ciclo de aclimatización).

La escala de la salida del cepellón utilizada fue la siguiente: grado 0- al extraer la vitroplanta del contenedor sale menos del 25% del cepellón conformado por el sustrato adherido a las raíces de la planta; grado 1- sale entre 25-50%; grado 2- sale entre 50-75 y grado 3 sale más del 75% del cepellón. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple con prueba de rango múltiple de Duncan para el 5%.

Todas las observaciones de los experimentos fueron registradas mediante el programa Excel y el procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables, se realizó a través del paquete estadístico SPSS versión 8.1.3 para windows, con el mismo se efectuó la previa comparación de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos, y posteriormente los análisis de varianza correspondientes para cada ensayo.

Tabla 2. Tratamientos aplicados en el medio de cultivo para la fase de enraizamiento de las plantas *in vitro* de FHIA-21.

Tratamientos	BIOBRAS-6 (mg.l <sup>-1</sup> )	AIA (mg.l <sup>-1</sup> )
1	0.01	-
2	0.05	-
3	0.01	0.65
4	0.05	0.65
5	0.01	1.3
6	0.05	1.3
7 (control)	-	1.3

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Efecto del BIOBRAS-6 en la Fase de Multiplicación del FHIA-21

#### Medio de cultivo semisólido

Como se puede observar en la tabla 3 el número de brotes y el coeficiente de multiplicación manifestaron diferencias estadísticas, favorables a los tratamientos 5 y 6. Estas variables son los indicadores principales para esta etapa. En el número de raíces los valores inferiores correspondieron al mejor tratamiento para

las variables anteriormente descritas, o sea que existió una relación inversa pero que es la esperada en esta etapa; los explantes con mayor número de raíces presentan menor coeficiente de multiplicación. El comportamiento del Brasiñoesteroide estuvo relacionado con su efecto sobre la elongación y crecimiento de las plantas (Barranco, 2001). El efecto descrito del BIOBRAS-6 sobre el crecimiento de las plantas en correspondencia con la acción del 6BAP sobre la división celular permitió un balance adecuado para obtener valores superiores del número de brotes y coeficiente de multiplicación (tratamientos 5 y 6).

Tabla 3. Efecto del BIOBRAS-6 en los medios de cultivo semisólidos sobre diferentes variables de la fase de multiplicación en el cultivar FHIA-21.

Tratamientos.	Número de Brotes	Coeficiente de multiplicación	Número de raíces	Altura de las plantas (cm)
1 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> )	1.3 c	1.14 d	6.1 c	2.9 ab
2 (BIOBRAS-6 0.05 mg.l <sup>-1</sup> )	1.7 c	1.06 d	7.9 c	3.2 a
3 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 2 mg.l <sup>-1</sup> )	2.6 b	2.2 c	0.6 a	2.5 bc
4 (BIOBRAS-6 0.05 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 2 mg.l <sup>-1</sup> )	2.9 b	2.5 c	1.3 b	2.7 b
5 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 4 mg.l <sup>-1</sup> )	3.4 a	3.1 a	0 a	2.3 c
6 (BIOBRAS-6 0.05 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 4 mg.l <sup>-1</sup> )	3.8 a	3.5 a	0 a	2.6 b
7 Control (AIA 0.65 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 4 mg.l <sup>-1</sup> )	3.1 a	2.8 b	0.2 a	2.5 bc

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente según Duncan ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos evidenciaron un efecto positivo del BIOBRAS-6 como sustituto del AIA en el medio de cultivo de multiplicación del plátano FHIA-21 en adición con el 6BAP. Como respuesta a los brasinoesteroides se logran en las plantas

efectos tales como la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo y la modulación del estrés (Núñez, 2000).

Tabla 4. Efecto de BIOBRAS-6 y el 6-BAP en medios de cultivo líquidos, sobre diferentes variables de la fase de multiplicación del cultivar FHIA-21.

Tratamientos.	Número de Brotes	Coefficiente de multiplicación	Número de raíces	Altura de las plantas (cm)
1 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> )	1.1 c	1.0 d	5.3 c	2.8
2 (BIOBRAS-6 0.05 mg.l <sup>-1</sup> )	1.1 c	1.0 d	5.5 c	2.9
3 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 2 mg.l <sup>-1</sup> )	2.2 b	1.8 c	0.3 a	2.6
4 (BIOBRAS-6 0.05 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 2 mg.l <sup>-1</sup> )	2.4 b	2.1 c	1.3 b	2.7
5 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 4 mg.l <sup>-1</sup> )	2.7 a	2.5 a	0 a	2.4
6 (BIOBRAS-6 0.01 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 4 mg.l <sup>-1</sup> )	3.0 a	2.8 a	0 a	2.7
7 Control (AIA 0.65 mg.l <sup>-1</sup> + 6BAP 4 mg.l <sup>-1</sup> )	2.7 a	2.5 a	0.2 a	2.5

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente según Duncan ( $p < 0.05$ )

### Medio de cultivo líquido

Al analizar los resultados obtenidos en las aplicaciones del BIOBRAS-6 al medio de cultivo para la fase de multiplicación en estado líquido del cultivar de plátano FHIA-21, se pudo apreciar un comportamiento similar al logrado en los medios de cultivo en estado semisólido, mantuvieron diferencias estadísticas los tratamientos 6 (4.0 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP+ 0.05 mg.l<sup>-1</sup> BIOBRAS-6) y 5 (4.0 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP+ 0.01 mg.l<sup>-1</sup> BIOBRAS-6) con respecto a los tratamientos uno, dos, tres y cuatro. En cuanto al número de raíces, encontramos los valores superiores en los tratamientos uno y dos los cuales difieren estadísticamente con los tratamientos restantes que presentan 6BAP en su composición lo que demuestra un efecto marcado del 6-BAP en la

división celular, promueve la formación de brotes y por consiguiente disminuye la formación de raíces. El BIOBRAS-6 ha sido utilizado con buenos resultados en multiplicación *in vitro* de la jojoba (Núñez, 2000).

El efecto logrado por este brasinoesteroide en los ensayos de multiplicación en medios de cultivo semisólidos y líquidos radica fundamentalmente en su acción auxínica, que garantizó un balance hormonal adecuado en las plantas favorables para el incremento de los brotes y el coeficiente de multiplicación.

### Influencia del BIOBRAS-6 en el comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento

Tabla 5. Influencia del BIOBRAS-6 sobre el comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento del cultivar FHIA-21.

Tratamientos.	Número de raíces	Altura de la planta (cm)	Peso fresco de la planta (g)
1 BIOBRAS-6 ( 0.01 mg.l <sup>-1</sup> )	4.9 c	3.8 b	1.8 c
2 BIOBRAS-6 ( 0.05 mg.l <sup>-1</sup> )	5.1 c	4.0 b	2.0 bc
3 BIOBRAS-6 ( 0.01 mg.l <sup>-1</sup> ) + AIA (0.65 mg.l <sup>-1</sup> )	5.6 b	4.2 b	2.3 b
4 BIOBRAS-6 ( 0.05 mg.l <sup>-1</sup> ) + AIA 0.65 mg.l <sup>-1</sup> )	5.8 b	4.3 b	2.3 b
5 BIOBRAS-6 ( 0.01 mg.l <sup>-1</sup> ) AIA (1.3 mg.l <sup>-1</sup> )	6.2 a	4.8 a	2.6 a
6 BIOBRAS-6 ( 0.05 mg.l <sup>-1</sup> ) AIA (1.3 mg.l <sup>-1</sup> )	6.3 a	4.9 a	2.6 a
7 (control) AIA (1.3 mg.l <sup>-1</sup> )	5.4 b	4.6 a	2.5 a

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente según Duncan ( $p < 0.05$ )

En la tabla 5 se observa que la combinación de BIOBRAS y la auxina AIA ofreció los mejores resultados (tratamientos cinco y seis) lo que parece corroborar el papel de reforzamiento auxínico del BIOBRAS-6 señalado por Núñez (2000) al estudiar combinaciones de este producto con el AIA para la fase de enraizamiento de plátanos y bananos.

El porcentaje de brotación de los explantes y número de hojas no presentaron diferencias significativas.

### Comportamiento de las plantas *in vitro* del cultivar FHIA-21 en la fase de aclimatización

El tratamiento cuatro que correspondió al BIOBRAS-6 en la concentración de 0.05 mg.l<sup>-1</sup> y ANA 10 mg.l<sup>-1</sup>

presentó valores superiores en relación con los tratamientos del BIOBRAS-6 solo y con aplicación del ANA 10 mg.l<sup>-1</sup> (control y tratamiento cinco, respectivamente). En la variable porcentaje de

supervivencia no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Todos los tratamientos fueron superiores al control (Tabla 6.)

Tabla 6. Resultados después de la aplicación de BIOBRAS-6 por inmersión a las raíces de plantas *in vitro* del cultivar de plátano FHIA-21 en la fase de aclimatación.

Tratamientos	Variables Analizadas		
	Número de hojas	Salida del cepellón	Peso seco de la planta (g)
1	7.22 a	2.78 b	23.6 a
2	7.60 a	2.83 b	26.4 a
3	7.62 a	2.81 b	24.2 a
4	7.85 a	2.93 a	28.5 a
5	6.89 b	2.84 b	23.9 a
6	6.63 b	2.66 c	20.8 b

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

Los resultados en las figuras 1 y 2 mostraron que las variables analizadas fueron superiores en los tratamientos del brasinoesteroide combinado con el

ANA. Los valores inferiores correspondieron al control, en relación con el cual los restantes tratamientos presentaron diferencias significativas.

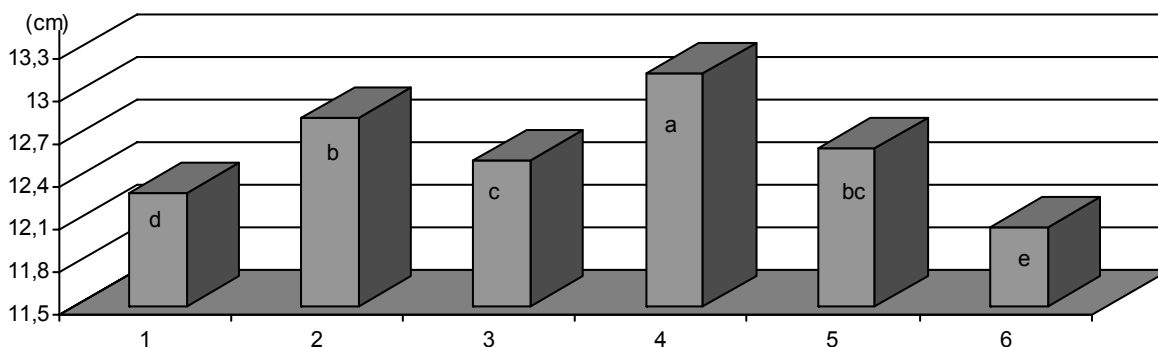


Figura 1. Influencia del BIOBRAS-6 sobre el comportamiento de la altura de plantas en la fase de aclimatación.

Leyenda:

1- BIOBRAS-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>)

2- BIOBRAS-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>) + ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>)

3- BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>)

4- BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) + ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>)

5- ANA 10 mg.l<sup>-1</sup>)

6- Control (agua común)

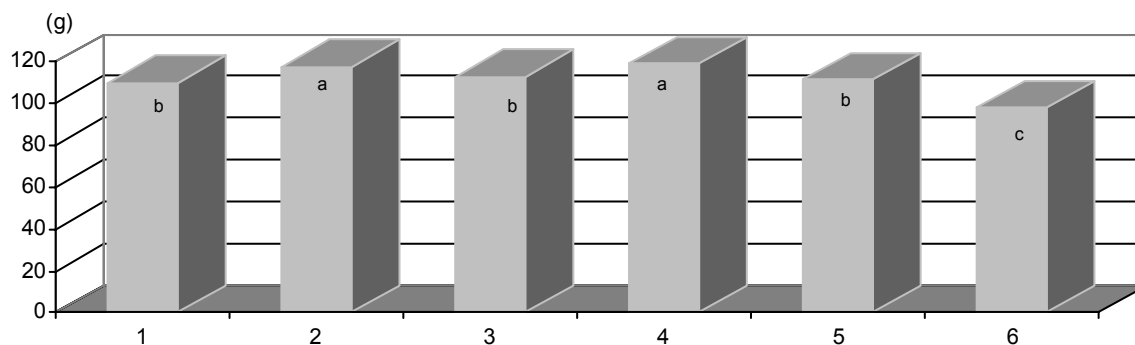


Figura 2. Influencia del BIOBRAS-6 sobre el peso fresco de plantas en la fase de aclimatación.

Leyenda:

1- BIOBRAS-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>)

2- BIOBRAS-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>) + ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>)

3- BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>)

4- BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) + ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>)

5- ANA 10 mg.l<sup>-1</sup>)

6- Control (agua común)

De forma general no existieron diferencias entre las concentraciones del Brasinoesteroide, pero se logró un reforzamiento del efecto del regulador de crecimiento (ANA) en las combinaciones con el mismo. Estos resultados demostraron las potencialidades de este producto como regulador del crecimiento vegetal. Agramonte (2000) observó resultados similares en la adaptación de vitroplantas de papa, con aplicación de BIOBRAS-6 (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y ANA (10 mg.l<sup>-1</sup>) se redujo el ciclo vegetativo de las vitroplantas en esta etapa.

## CONCLUSIONES

Se logró un incremento de los indicadores número de brotes y coeficiente de multiplicación, en la fase de multiplicación del híbrido FHIA-21, al adicionar el BIOBRAS-6 a una concentración de 0.05mg.l<sup>-1</sup> al 6BAP 4mg.l<sup>-1</sup> para los medios de cultivo en estado fásico semisólido y líquido.

La aplicación del BIOBRAS-6 al medio de cultivo en la fase de enraizamiento, a una concentración de 0.01 mg.l<sup>-1</sup> en adición con el AIA 1.3 mg.l<sup>-1</sup>, demostró un marcado efecto de reforzamiento auxínico.

El BIOBRAS-6, 0.05 mg.l<sup>-1</sup> en adición con el ANA 10 mg.l<sup>-1</sup> por inmersión de las raíces durante 10 minutos antes de la plantación en la fase de aclimatización condujo a lograr plantas con incremento en los indicadores del crecimiento y desarrollo para esta etapa.

## REFERENCIAS

Agramonte, D (2000) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Désirée. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas IBP Santa Clara. Cuba

Barranco, LA (2001) Desarrollo de la Embriogénesis Somática en medios líquidos (*Musa* AAA cv. Gran Enano) Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Centro de Bioplasmas. Ciego de Avila. Cuba

Bermúdez, I, Orellana P, Pérez J N, Clavero J, Veitía N, Romero C, Mujica R, García L (2000) Mejoramiento del clon híbrido de plátano FHIA-21 con el uso de la mutagénesis *in vitro*. En: Infomusa Vol.9 No. 1: 16-19

Núñez, M (2000) Tendencias actuales del uso de los brasinoesteroides en la agricultura. En: XII Seminario Científico INCA, p. 24

Murashige, T y F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-479