

EFFECTO DE LAS SALES INORGÁNICAS DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy)

CULTURE MEDIA INORGANIC SALTS EFFECT ON PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) GROWTH

Ylvi M. Martínez-Villegas¹, María Andrade-Rodríguez^{1*}, M. Teresa Colinas-León², Óscar G. Villegas-Torres¹, Antonio Castillo-Gutiérrez¹ e Irán Alia-Tejacal¹

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. 62209, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. ²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 carr. México-Texcoco. 56230, Chapingo, Estado de México.

*Autor para correspondencia (maria.andrade@uaem.mx)

RESUMEN

La pascuita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) es una eupforbiacea semicultivada y comercializada para ornato en navidad, sea como maceta o como planta para jardín. En Morelos, México su propagación se hace por estacas; sin embargo, su producción es escasa debido a la poca disponibilidad de material vegetal, mala calidad del mismo, escaso enraizamiento, y pérdidas por pudriciones. Por ello resulta necesario evaluar otras formas de propagación masiva *in vitro* a partir de plantas madre sanas, y seleccionadas por la cantidad de inflorescencias, tamaño y color de las brácteas, así como por el vigor de su crecimiento. Aquí se planteó comparar diferentes medios de cultivo (MS 50 %, MS 25 %, WPMm, WPMm1, WPMm2 y WPMm3) sin reguladores del crecimiento, para elegir a los que mejor promovieran el crecimiento *in vitro* de brotes de pascuita. Las variables medidas fueron: altura de brote, diámetro de tallo, número de hojas, contenido relativo de clorofila y peso de materia seca. Los efectos más significativos se observaron cuando los propágulos fueron cultivados en el medio WMPm porque generaron brotes con mayor diámetro (1.35 mm), más contenido de clorofila (41.44 unidades Spad), más materia seca por brote (92.2 mg), follaje de color verde más intenso, y mayor producción de raíz. En contraste, el medio de cultivo MS 25 % produjo plantas con escaso crecimiento. Se concluyó que el medio de cultivo WPMm fue el que produjo mejor respuesta.

Palabras clave: *Euphorbia leucocephala*, medio de cultivo, propagación *in vitro*.

SUMMARY

Pascuita is a semi-cultivated euphorbiacea marketed as potted ornamental or for direct garden planting during Christmas. In Morelos México propagation is done by cuttings; however, its low yield is due to limited availability of plant material, poor quality, scarce rooting, and losses caused by rots. Therefore, it is necessary to evaluate other forms of mass propagation from healthy mother plants, selected by the number of inflorescences, bract size, bract color, and growth strength. This research determined the effect of *in vitro* inorganic salts promoting the most vigorous shoot growth of *E. leucocephala*. The effect of salts of culture media (MS 50 %, MS 25 %, WPMm, WPMm1, WPMm2 and WPMm3) without growth regulators was studied in a completely randomized experimental design. Shoot height, stem diameter, number of leaves, relative chlorophyll content and dry matter weight were recorded. Medium inorganic salts had a highly significant effect. The WMPm medium generated shoots with the largest diameter (1.35 mm),

the highest chlorophyll content (41.44 Spad units), the highest dry matter weight (92.2 mg), as well as brightest green foliage and vigorous root production. By contrast, MS culture medium at 25 % strength caused less shoot growth and undesirable qualitative characteristics. It was concluded that the WPMm medium was the most suitable.

Index words: *Euphorbia leucocephala*, culture medium, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

En México la familia *Euphorbiaceae* está representada por 43 géneros (Steinmann, 2002), e incluye a numerosas especies con potencial comercial como la pascuita o pascua blanca (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) que es un arbusto tropical nativo del sureste de México, Guatemala y el Salvador (Standley y Steyermark, 1949). Esta planta es utilizada para la decoración de casas y jardines porque su floración es atractiva, sus inflorescencias están compuestas por pequeñas flores aromáticas rodeadas por brácteas blancas. Al igual que la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd.), la pascuita florece durante la época navideña.

La pascuita se propaga por estacas de madera dura; al respecto, los productores indican que este método de multiplicación presenta problemas de alta mortalidad de estacas y bajo porcentaje de enraizamiento. Además, se dispone de poco material vegetativo de calidad. Lo anterior sugiere la necesidad de evaluar otras formas de propagación y dar solución a la demanda comercial creciente, así como contribuir a la conservación de este recurso fitogenético.

La aplicación del cultivo *in vitro* de tejidos ofrece apoyo a los métodos de propagación tradicionales, al permitir la propagación masiva de una especie; también es ampliamente utilizada para la preservación de especies de interés comercial, en peligro de extinción o de alto valor fitogenético (George *et al.*, 2008). El éxito del cultivo *in vitro* radica

en la naturaleza del medio de cultivo empleado (George *et al.*, 2008); el medio más utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962) que ha demostrado ser eficiente para la obtención y multiplicación de la mayoría de angiospermas (George *et al.*, 2008).

El medio MS es considerado rico en sales (Cassells y Curry, 2001) pues contiene altas concentraciones de iones amonio NH_4^+ (20.6 mM), iones nitrato NO_3^- (39.4 mM), iones cloro Cl^- (6.0 mM) y MoO_4^{2-} (1.0 mM). Sin embargo, contiene concentraciones de Ca (3.0 mM), PO_4^{3-} (1.3 mM), Mg^{2+} (1.5 mM) y Cu^{++} (0.1 mM) relativamente bajas en comparación con otros medios de cultivo como el DKW (Driver-Kuniyuki Walnut) (George *et al.*, 2008). Por el contrario, el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) es un medio considerado como de baja concentración en sales NH_4^+ (5 mM), NO_3^- (9.7 mM) y Cl^- (1.3 mM), y es utilizado para el cultivo de plantas leñosas (Lloyd y McCown, 1981) que presentan toxicidad en altas concentraciones de sales. Parada y Villegas (2009) afirman que el CaCl_2 es considerado tóxico para especies leñosas, motivo por el cual reformularon el medio WPM como WPMm, el cual carece de cloruro de calcio.

La propagación *in vitro* de pascuita en el medio de cultivo MS no promovió crecimiento adecuado, ya que los brotes establecidos en este medio presentaron necrosis apical, senescencia temprana y abscisión de hojas basales, síntomas correspondientes a toxicidad por sales. En cambio, Ruzic *et al.* (2000) y Mesa (2003) mencionan que estas características se deben entre otros factores, a los desbalances iónicos y relaciones nutricionales del medio de cultivo. Con base en lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el medio de cultivo que promueva el mayor crecimiento de brotes de *Euphorbia leucocephala*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron yemas apicales tomadas de ramas de las plantas madre de origen clonal de pascuita var. Rosa finale de dos años de edad aproximadamente, provenientes de viveros comerciales de la localidad de San Gaspar, en Morelos, México.

Establecimiento *in vitro*

Los ápices de brote de consistencia herbácea, de 1 cm de longitud se llevaron al laboratorio donde se lavaron con jabón antibacterial y agua corriente. Se colocaron en solución de Captan® (1 g L⁻¹, i.a. N-triclorometil dicarboximida) y Agrimycin 500® (1 g L⁻¹, i.a. sulfato de estreptomicina y clorhidrato de oxitetraciclina) durante 10 min en agitación constante; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, los ápices fueron desinfectados mediante inmersión durante 10 min en agitación continua, en solución de

hipoclorito de sodio comercial diluida a 10 % (v/v); por último se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

El material vegetal se colocó en una caja petri esterilizada, y con ayuda de microscopio estereoscópico, pinzas y bisturí esterilizados, se eliminaron tejidos para dejar solo los ápices caulinares. En cada recipiente de 220 cm³ con 30 mL de medio de cultivo WPMm se establecieron cinco explantes. Se taparon y sellaron los frascos con cinta plástica y se incubaron durante seis semanas a 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16/8 h con intensidad luminosa de 29 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurrido el periodo de incubación, se seleccionaron brotes y se tomaron secciones apicales homogéneas de 1 cm de longitud que fueron transferidas a medio de cultivo según tratamiento.

Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron seis medios de cultivo: MS 50 %, MS 25 %, WPMm, WPMm1, WPMm2 y WPMm3 (Cuadro 1), suplementados con 3 % de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol y 0.4 mg L⁻¹ de tiamina-HCl; en todos el pH se ajustó a 5.7 antes de agregar 0.7 % de agar. Se usaron frascos de 220 mL con 30 mL de medio de cultivo. El medio fue esterilizado durante 18 min a 120 °C y 1.054 kg cm⁻² de presión. Se determinó el potencial osmótico (MPa) de los medios de cultivo con ayuda de un osmómetro (Löser Messtechnik®, modelo TYP 6, China). Se establecieron cinco ápices de 1 cm de longitud por frasco. Los cultivos fueron incubados durante 45 d a 25 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16/8 h e intensidad luminosa de 29 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, cuya unidad experimental fue un frasco de cultivo con cinco ápices, y con siete repeticiones por tratamiento. A los 42 d del establecimiento, se midió: altura de brote, diámetro de tallo, número de hojas, contenido relativo de clorofila y peso de materia seca. El contenido de clorofila se midió cuatro veces por planta en la parte media de la hoja, con un medidor portátil de clorofila (SPAD-502®, Minolta, Illinois, USA), y se obtuvo el promedio por repetición.

Los datos así obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS, 2002). Las variables evaluadas en conteos se transformaron con la función arcoseno, previo al análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento *in vitro* de brotes de *E. leucocephala* tuvo efecto significativo ($P \leq 0.05$) en las variables diámetro de tallo, número de hojas, contenido relativo de clorofila, peso de materia seca, y altura

Cuadro 1. Concentración de macro y micronutrientos de seis medios de cultivo para inducir el crecimiento de plantas de pascuita (*E. leucocephala* Lotsy).

Nutriente	MS 25 % (mg L ⁻¹)	MS 50 % (mg L ⁻¹)	WPMm (mg L ⁻¹)	WPMm1 (mg L ⁻¹)	WPMm2 (mg L ⁻¹)	WPMm3 (mg L ⁻¹)
Macronutrientos						
NH ₄ NO ₃	412.5	825	400	400	400	400
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		----	695	695	695	695
KNO ₃	475.0	950	----	----	----	----
Mg SO ₄	92.5	185	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	42.5	85	170	170	170	170
CaCl ₂ ·7H ₂ O	110.0	220	----	----	----	----
Quelatos						
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	9.3	18.6	37.2	37.2	----	----
Fe EDTA		----	----	----	0.03	0.03
Micronutrientos						
FeSO ₄ ·7H ₂ O	6.95	13.9	27.8	27.8	----	----
H ₃ BO ₃	1.55	3.1	6.2	6.2	6.2	6.2
H ₂ MoO ₄		----	----	0.16	----	0.16
Mn SO ₄ ·4H ₂ O	5.57	11.15	22.3	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.15	4.3	8.6	8.6	8.6	8.6
Na ₂ Mo O ₄ ·2H ₂ O	0.0625	0.125	0.25	----	0.25	----
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00625	0.0125	0.25	0.25	0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00625	0.0125	----	----	----	----
KI	2.07	4.15	----	----	----	----

MS = medio Murashige y Skoog (1962); WPMm = medio WPM modificado por Parada y Villegas (2009); WPMm1 = medio WPMm con ácido molibídico en lugar de molibdato de sodio; WPMm2 = medio WPMm con quelato de hierro en lugar de EDTA de sodio; WPMm3 = medio WPMm con ácido molibídico y quelato de hierro.

de brote. El coeficiente de variación en todas las variables estudiadas fue menor a 12 %.

Los brotes de mayor altura se obtuvieron con las sales inorgánicas MS diluidas a 50 % con una altura de 17 mm, magnitud que fue estadísticamente igual (Tukey ≤ 0.05) a los valores 16 a 16.6 mm que tuvieron los brotes desarrollados en los medios WPM modificados (1, 2 y 3). La altura de los brotes cultivados con las sales WPMm y MS 25 % fue la menor (Cuadro 2). Jasrai *et al.* (2003), Pickens *et al.* (2005) y Clarke *et al.* (2006) han utilizado el medio MS a 100 % de la concentración de las sales para la micropropagación de euforbias, sin mencionar algún tipo de problema fisiológico o de crecimiento en las plantas cultivadas.

El diámetro de la mayoría de los brotes cultivados en las distintas sales fue estadísticamente igual, con excepción del medio WPMm3 que generó las plantas de tallo más delgado (Cuadro 2).

El número de hojas por brote fue mayor en los medios con las sales WPMm2, WPMm3, MS 50 % y WPMm. Sin embargo, las hojas de los brotes cultivados en los medios con las sales WPMm y WPMm3 fueron más grandes, por lo que los brotes tuvieron mayor contenido de materia seca (Figura 1), y también un color verde intenso. En contraste, las hojas de los brotes cultivados en los medios WPMm1 y WPMm2 presentaron áreas cloróticas, y en algunos brotes se observaron manchas color marrón y necrosis en hojas basales. Se observó disminución de senescencia y abscisión de hojas en comparación con lo que ocurría en el medio MS en ensayos anteriores.

El medio con las sales MS diluidas a 25 % formó en promedio solo cuatro hojas por planta, lo que permitió suponer que la concentración de nutrientes es muy baja para abastecer a los brotes de pascuita (Cuadro 2). Cualitativamente, el aspecto de las hojas de los brotes cultivados en el medio MS 50 % presentaron deshidratación (lámina foliar retraída), clorosis, senescencia y abscisión de hojas (Figura 2), debido

Cuadro 2. Efecto de seis medios de cultivo en el crecimiento *in vitro* de brotes de pascuita (*E. leucocephala* Lotsy).

Medio de cultivo	Potencial osmótico (MPa)	Altura de brote (mm)	Diámetro de tallo (mm)	Núm. de hojas	CRC (Spad)
MS 25 %	-0.202	15.25 b	1.32 ab	4.11 c	26.92 d
MS 50 %	-0.272	17.37 a	1.33 ab	5.76 ab	32.97 c
WPMm	-0.217	15.02 b	1.35 a	5.46 ab	41.44 a
WPMm1	-0.238	15.98 ab	1.25 ab	5.40 b	37.42 b
WPMm2	-0.233	16.62 ab	1.35 a	6.31 a	34.14 c
WPMm3	-0.222	16.23 ab	1.18 b	5.91 ab	39.02 ab
DMSH (P ≤ 0.05)		2.06	1.14	0.89	3.2

DMSH = diferencia mínima significativa honesta; CRC= contenido relativo de clorofila. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

entre otros factores a que su potencial osmótico fue más bajo. Según Lerner (1985) y Mesa (2003), estos síntomas son debidos al efecto tóxico de los iones, como resultado de altos contenidos de solutos en el medio y por el estrés hídrico impuesto por la disminución del potencial osmótico.

Las plantas (brotes con raíz) cultivadas en las sales del medio WPMm y del medio WPMm3, tuvieron el mayor contenido relativo de clorofila (CRC) en sus hojas, con 41.4 y 39.0 unidades respectivamente (Cuadro 2). Con respecto al CRC se observó que las hojas que contenían la mayor cantidad de clorofila fueron las que se formaron en las plantas (brotes con raíz) cultivadas en los medios con las sales WPMm y WPMm3. Los brotes cultivados en los medios MS 50 % y WPMm2 fueron estadísticamente iguales entre sí, y con hojas cloróticas como en los medios WPMm1 y MS 25 %, lo que concuerda con los respectivos valores de CRC.

Una causa probable de la clorosis en los brotes cultivados en el medio WPMm1 (en el que el molibdato de sodio fue sustituido por ácido molibídico) es que la cantidad del compuesto sustituto haya sido inferior a la requerida para el crecimiento normal de las plantas, ya que el molibdeno se requiere para la síntesis y activación de la enzima nitrato reductasa, vital para el adecuado crecimiento de planta. En caso de deficiencia de Mo los síntomas se observan en las hojas, cuyos tamaños se reducen, presentan clorosis y moteados marrón (en toda o parte de la hoja) y zonas necróticas en casos severos (George *et al.*, 2008).

La mayor acumulación de biomasa se obtuvo en las plantas cultivadas en el medio WPMm (92.2 mg por planta), seguida por las cultivadas en el medio WPMm3 que tuvieron peso promedio de 81.1 mg. Los brotes cultivados en los medios MS 50 %, WPMm1 y WPMm2 fueron estadísticamente iguales entre ellos, con reducciones de 27 a 35 mg en comparación con los brotes obtenidos en el medio WPMm (Figura 1). Esta notoria disminución en la cantidad de bio-

masa puede deberse al efecto del menor potencial osmótico del medio de cultivo, ya que según Pierik y Steegmans (1975) el crecimiento y organogénesis de las plantas *in vitro* disminuye por efecto del potencial osmótico, y se detiene si éste es inferior a -0.3 MPa porque impide la absorción de agua por la planta.

Sin embargo, la acumulación de materia seca también depende de la composición nutricional del medio de cultivo. Como se ilustra en la Figura 1, aunque los medios WPMm1 y MS 50% tuvieron menor potencial osmótico que el medio WPMm2, la acumulación de biomasa seca de los brotes tuvo mayor valor en los primeros. La baja concentración de nutrientes en el medio de cultivo generó menor expresión en el crecimiento, ya que en cuatro de las cinco variables estudiadas se presentaron los valores más bajos en el medio MS 25 %; este resultado indicó el efecto negativo de las bajas concentraciones de nutrientes sobre el crecimiento de los brotes.

Los brotes cultivados en medio MS presentaron características desfavorables en el crecimiento y nula formación de raíces. El mayor potencial osmótico del medio MS 25 % favoreció una mayor hidratación de los brotes, pero la cantidad de nutrientes que aportó no fue suficiente para su crecimiento adecuado; en tanto que el menor potencial osmótico del MS 50 % dificultó la absorción de agua y de nutrientes.

Según Morard y Henry (1998), señalan que el potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en el crecimiento de los explantes, pues conforme se reduce también es menor la absorción de agua y nutrientes, lo que dificulta el crecimiento y multiplicación de brotes. Por su parte, Pierik (1990) señala que la concentración total de las sales de un medio de cultivo determina su potencial osmótico, de modo que al aumentar la concentración de iones en la solución el potencial osmótico se reduce (Larqué-Saviedra y Trejo, 1990), al igual que la salinidad que reduce

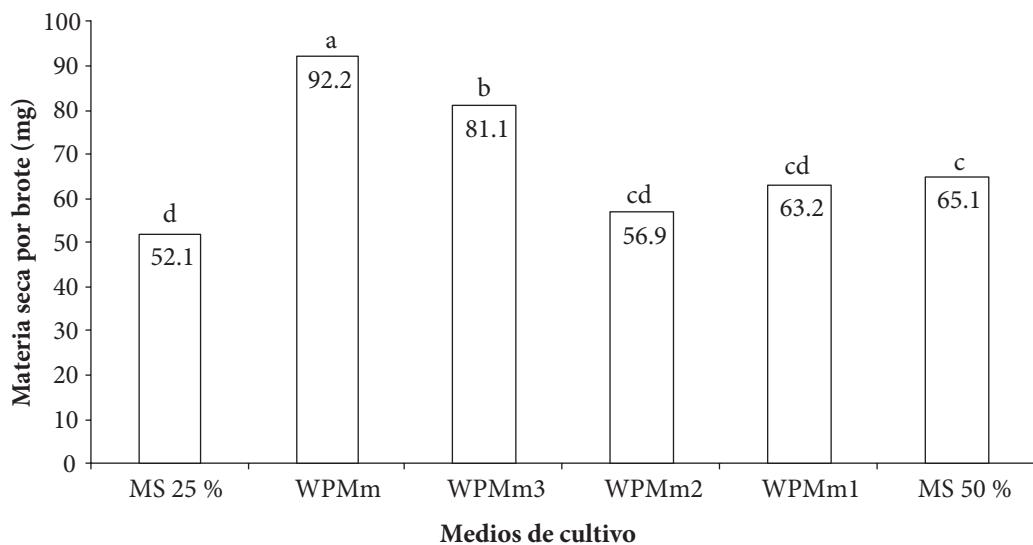


Figura 1. Efecto del medio de cultivo en la acumulación de materia seca en brotes de *E. leucocephala* Lotsy.



Figura 2. Brotes de *E. leucocephala* Lotsy cultivados *in vitro* por 42 d en seis medios de cultivo. A = MS 25 %; B = MS 50 %; C = WPMm; D = WPMm1; E = WPMm2; F = WPMm3.

el transporte del agua y asimilación de nutrientes (Silva *et al.*, 2004).

En el medio de cultivo WPMm3 se obtuvieron brotes de buena apariencia, con altura superior a 16 mm y con 5 a 6 hojas sin síntomas de clorosis, en correspondencia con su alta concentración de clorofila foliar (39 unidades); además,

hubo emisión de raíces y su peso de materia seca fue cercano al mayor peso obtenido. El medio de cultivo WPMm fue el que indujo el mejor crecimiento de plantas de pascuita, ya que sobresalieron entre los demás tratamientos por tener mayor grosor de tallo, hojas de color verde intenso y mayor producción de sistema radical, lo que permitió la mayor acumulación de biomasa (Figuras 1 y 2).

CONCLUSIONES

Las sales del medio de cultivo WPMm fueron mejores que las de los otros cinco tratamientos para el crecimiento *in vitro* de pascuita, porque generaron plantas con tallos de mayor grosor, hojas con más contenido de clorofila, y mayor acumulación de materia seca. Los brotes cultivados en este medio presentaron también las hojas más grandes, de color verde más intenso y con presencia de raíz.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor expresa su agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 255768), para la realización de estudios de Maestría, y a la Red de Nochebuena SAGARPA-SNICS-SINAREFI por el apoyo para la realización de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Cassells A. and R. Curry (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64:145-157.
- Clarke J. L., S. S. Klemstad, E. Floistad, A. K. Hvoslef-Eide, S. Haugslieen, R. Moe and D. R. Blystad (2006) Genetic engineering of Poinsettia with the aim of enhancing its resistance to *Poinsettia Mosaic Virus*. *Acta Horticulturae* 722:321-325.
- George E. F., M. A. Hall and G. De Klerk (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer. The Netherlands. 479 p.
- Larqué-Saavedra A. y C. Trejo (1990) El Agua en las Plantas. Ed. Trillas. México. 88 p.
- Jasrai Y. T., K. N. Thaker and M. C. D'Souza (2003) *In vitro* propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 13:31-36.
- Lerner H. (1985) Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil* 89:3-14.
- Lloyd G. and B. McCown (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society* 30:421-427.
- Mesa D. (2003) Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* 37:217-226.
- Morard P. and M. Henry (1998) Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of Plant Nutrition* 21:565-1576.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Parada P. D. M. y A. Villegas M. (2009) Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:103-109.
- Pickens K. A., Z. M. Cheng and R. N. Trigiano (2005) Axillary bud proliferation and organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* Winter rose. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41:470-474.
- Pierik R. L. M. (1990) Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundiprensa. Madrid, España. 326 p.
- Pierik R. L. M. and H. H. M. Steegmans (1975) Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendron. *Scientia Horticulturae* 3:1-20.
- Ruzic D., M. Saric, R. Cerovic and L. Culatif (2000) Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63:9-14.
- SAS (2002) SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. Proprietary Software Version 9.00 (TS M0).
- Silva M. C., A Villegas M., P. S. García, G. A. González, M. N. R. Menjeda y L. M. R. Posadas (2004) Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110". *Interciencia* 29:384-388.
- Standley P. C. and J. A. Steyermark (1949) Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany* 24:106-107.
- Steinmann W. V. (2002) Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana* 61:61-93.
- Villegas A., C. Mazuelos, M. Cantos y A. Troncoso (1992) Influencia del nitrógeno sobre el desarrollo *in vitro* del portainjerto de vid 161-49. *Suelo y Planta* 2:529-539.