

CULTIVO *IN VITRO* DE GERBERA (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) Y SU ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO

Victoria Z. Olivera-Ortega¹, María A. Gutiérrez-Espinosa¹, Jorge A. Gutiérrez-Espinosa¹ y María Andrade-Rodríguez²

RESUMEN

La gerbera se puede propagar por medio de semilla, división de planta, esqueje o cultivo *in vitro*. Este último método de propagación ofrece la posibilidad de obtener plantas homogéneas, en mayor cantidad, libres de patógenos y en cualquier época del año. De ahí, que en esta investigación se consideró de interés evaluar la respuesta organogénica de *Gerbera jamesonii* H. Bolus bajo cultivo *in vitro* y su aclimatación en invernadero. El estudio se dividió en tres fases experimentales, en la primera se evaluaron diferentes concentraciones de benciladenina (BA), cinetina y tiazuron (TDZ) en la inducción y multiplicación de brotes *in vitro*. En la segunda fase se estudió el efecto de dos concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo en el enraizamiento *in vitro*; en la tercera se analizó el efecto residual de los tratamientos utilizados en las dos primeras fases así como el empleo de dos tipos de sustrato durante la aclimatación de las plántulas en el invernadero. En la primera fase la mayor formación de brotes se logró utilizando 8,8 μmolar de BA (5,4 brotes/explante). En la segunda fase, se observó que con 40 g L⁻¹ de sacarosa se obtuvo el enraizamiento más efectivo. En la tercera fase el porcentaje global de sobrevivencia en invernadero fue de 82,48 %, observándose efecto de los tratamientos usados durante la inducción de brotes, pues las plantitas obtenidas con el uso de cinetina dieron los mejores resultados de sobrevivencia (89,3 %).

Palabras clave adicionales: Respuesta organogénica, inducción de brotes, enraizamiento

ABSTRACT

In vitro culture of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) and its acclimation in greenhouse

Gerbera may be propagated by seed, plant division, cuttings or *in vitro* propagation. However, *in vitro* propagation allows to obtain big quantities of homogeneous plants of outstanding individuals, which are free from virus and other diseases. Thus, it is necessary to establish efficient protocols for the *in vitro* culture. The objective of this research was to evaluate the organogenic response of *Gerbera jamesonii* H. Bolus under *in vitro* culture and its acclimation in greenhouse. The study was divided in three experimental phases. In the first one, different levels of BA, TDZ and kinetine were evaluated for shoot induction and multiplication *in vitro*. In the second phase two levels of sucrose in the culture medium (20 and 40 g L⁻¹) were compared for *in vitro* rooting. In the third phase survival, growth and development of plantlets were evaluated under acclimation in greenhouse. In the first phase, it was observed that maximum shoot induction was obtained using 8.8 μmolar of BA (5.4 shoots/explant). In the second phase the best *in vitro* rooting resulted when using with 40 g L⁻¹ of sucrose. In the third phase, it was observed that the global percent of survival of plantlets in greenhouse was 82.48 %, while the highest percent (89.3 %) was reached in plants treated with kinetine.

Additional key word: Organogenic response, shoot induction, rooting

INTRODUCCIÓN

La gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) se puede propagar por medio de semilla, división de planta, esqueje o *in vitro*. La selección del método de propagación depende del material disponible así como de la demanda de plantas. La propagación *in vitro* permite obtener plantas

homogéneas, en mayor cantidad y libres de patógenos (Murashige et al., 1974; Zárraga y Granada, 1990).

Es importante considerar que el material vegetal utilizado en México para el establecimiento de los cultivos florícolas en general proviene del extranjero, lo que repercute en el incremento de los costos de producción; es

Recibido: Junio 19, 2000

Aceptado: Septiembre 21, 2000

¹ Especialidad de Fruticultura; Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México.

² Especialidad de Genética. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México.

aquí donde la micropropagación puede ser una alternativa para la disponibilidad del material vegetal que permita un mejor aprovechamiento del cultivo de gerbera.

A los medios de cultivo originalmente empleados para la propagación *in vitro* se les han adicionado varios reguladores del crecimiento en un rango muy amplio: ácido 3-indolacético (AIA) ($0,18 \text{ mg L}^{-1}$), Benciladenina (BA) ($0,2\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$), 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina (2iP) ($0,5\text{-}5,0 \text{ mg L}^{-1}$) y cinetina ($2,0\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$), obteniéndose un promedio de brotes satisfactorio al bajar la concentración de AIA e incrementar la cinetina hasta 10 mg L^{-1} (Pierik et al., 1973). Sin embargo, Pierik et al. (1982) encontraron que con 5 y 10 mg L^{-1} de cinetina hubo formación de callo y deformación en las hojas de las plantas, notando que tanto el 2iP como BA tenían un efecto positivo en la regeneración de brotes, aunque también en la formación de callo.

Para el enraizamiento de brotes de gerbera obtenidos *in vitro* se han utilizado dos procedimientos: enraizamiento *in vivo* y enraizamiento *in vitro*. La ventaja del primero radica en que a la vez que se está llevando a cabo el enraizamiento, los brotes se adaptan a las condiciones ambientales en las cuales crecerán y se desarrollarán las plantas; sin embargo, con este método existe una probabilidad muy alta de que el número de plántulas sobrevivientes sea bajo, ya que éstas aún no han desarrollado raíces para realizar sus funciones de absorción y transporte nutrimental. Con el segundo método se induce el enraizamiento *in vitro* y posteriormente los brotes son establecidos en las condiciones de adaptación, usando una humedad relativa alta durante el período de aclimatación, la cual se va reduciendo gradualmente hasta alcanzar el nivel normal en invernadero o campo (Pierik, 1990).

En el enraizamiento *in vitro*, en general se ha observado que la iniciación de raíz y la posibilidad de enraizamiento pueden aumentar de manera significativa al disminuir los niveles de sales minerales en el medio nutritivo e incrementar la concentración de sacarosa del 2 al 5 %, lo cual mejora el enraizamiento y la aclimatación en invernadero (Pierik et al., 1975).

Con base a lo anterior y considerando la importancia económica que reviste esta especie, es conveniente establecer protocolos de micropropagación y estudiar el efecto de éstos

durante la aclimatación en condiciones de invernadero. Este estudio contribuiría en la propagación clonal masiva de plantas uniformes, vigorosas, libres de patógenos que puedan estar disponibles en cualquier época del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Especialidad de Fruticultura y en un invernadero de las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo. de México. Se utilizaron plantas de gerbera previamente establecidas *in vitro*, provenientes del vivero San Fernando, ubicado en Coatepec de Harinas, Estado de México.

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) modificado por Zárraga y Granada (1990), suplementado con sacarosa (30 g L^{-1}) y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para evitar la formación de callo, y 80 mg L^{-1} de Sulfato de Adenina; el pH se ajustó a $5,7 \pm 0,1$ usando NaOH y HCl.

Fase de inducción de brotes

Bajo condiciones asépticas se disectaron brotes sin hojas visibles, con un tamaño aproximado de 2 cm de longitud y fueron establecidos en tubos de ensayo que contenían 10 mL del medio de cultivo. Este medio contenía, además de lo señalado, BA o cinetina en tres concentraciones (2,2; 4,4 y $8,8 \mu\text{molar}$) o tidiazuron (TDZ) en cinco concentraciones (0,45; 1,1; 2,2; 4,4 y $8,8 \mu\text{molar}$).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento y la evaluación se efectuó a las cinco semanas, cuantificando las variables: inicio de formación de brotes; número de brotes por explante y número de hojas por brote.

Fase de enraizamiento *in vitro*

Se utilizaron brotes de cinco variedades de gerbera de 2 cm de longitud con tres hojas como mínimo, usando el medio MS modificado por Zárraga y Granada (1990) al 50 % adicionando $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA, dos concentraciones de sacarosa (2 y 4 %, p/v) $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar ajustando el pH a $5,7 \pm 0,1$ con NaOH y HCl.

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con seis repeticiones por tratamiento donde cada repetición estuvo

integrada por un brote. En esta prueba no se incluyeron aquellos provenientes de los tratamientos con concentraciones de 8,8 μmolar debido a que presentaron deformación en brotes y hojas.

Las variables evaluadas fueron: inicio de formación de raíz (días), número de raíces y longitud de raíz (cm).

Una vez concluida la fase de enraizamiento *in vitro* se procedió a trasladar las plantitas provenientes de dicho experimento en charolas de unicel de 120 cavidades de 2 cm^2 .

Fase de aclimatación de las plantas

Se evaluaron dos sustratos: Sunshine Growing-Mix 3 marca Sun Gro[®] (mezcla comercial) y una mezcla de laboratorio, así como el efecto de los cuatro mejores tratamientos de inducción de brotes combinados con 20 y 40 g L^{-1} de sacarosa durante el enraizamiento de los brotes. La mezcla de laboratorio estuvo constituida por gránulos inertes de origen volcánico conocidos como "agrolita", suelo orgánico rico en humus y polvo de fibra de coco en proporción 1:2:1. El procedimiento consistió en eliminar los residuos de agar de las raíces y sumergir las plantitas en una solución de Captán (2 g L^{-1}). A los brotes que no presentaron raíz se les aplicó Radix 7500[®] para asegurar el enraizamiento.

La temperatura se mantuvo entre 35 y 38 $^{\circ}\text{C}$ durante el día y entre 15 y 18 $^{\circ}\text{C}$ durante la noche.

Al final de las cinco semanas, se evaluó el número de plantas sobrevivientes y se trasladaron a bolsas de polietileno que contenían los sustratos antes referidos, finalmente se colocaron en invernadero por un período de dos meses. Con la finalidad de evaluar el crecimiento y desarrollo de las plántulas, se evaluaron cada quince días las siguientes variables: número de hojas por planta, área foliar, peso fresco y peso seco.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con seis repeticiones. Se aplicó análisis de varianza a los resultados de cada prueba y separación de medias según la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de inducción de brotes

La aparición de brotes ocurrió entre el primer y tercer día, siendo en los tratamientos con TDZ donde (primeramente se inició) la formación de brotes (desde 0,8 días), seguidos por la cinetina (desde 1,7 días), mientras que con BA la formación de brotes se observó un poco más tarde (Cuadro 1). El número de hojas fue mayor en los tratamientos con BA (9,8-11,2) y cinetina (7,9-8,8) y considerablemente menor en los tratamientos que contenían TDZ. Por otro lado, se observó que el mayor número de brotes se logró utilizando 8,8 μmolar de BA (5,4 brotes/explante) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Respuesta organogénica en la fase de inducción de brotes de *Gerbera jamesonii* con varios reguladores de crecimiento.

Regulador del crecimiento	Concentración (μmolar)	I.F.B (Días)	Número de hojas	Número de brotes
BA	2,2	2,6 ab	11,2 a	4,7 ab
BA	4,4	3,3 a	9,8 a	4,7 ab
BA	8,8	3,2 a	10,8 a	5,4 a
CIN	2,2	1,7 bcde	7,9 a	3,2 abc
CIN	4,4	2,6 abc	8,6 a	3,3 abc
CIN	8,8	2,3 abcd	8,8 a	4,6 ab
TDZ	0,45	1,5 cde	2,8 b	2,6 bc
TDZ	1,1	2,1 abcde	3,1 b	2,7 bc
TDZ	2,2	1,3 cde	2,4 b	2,0 c
TDZ	4,4	0,8 e	1,8 b	1,7 c
TDZ	8,8	0,9 de	1,6 b	1,4 c

Valores con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($p=0,05$). I.F.B= Inicio de formación de brotes; BA= Benciladenina; CIN= Cinetina; TDZ= Tidiazuron.

A pesar de que los tratamientos con cinetina mostraron un efecto intermedio en las tres variables evaluadas, se observó que los brotes

obtenidos con esta hormona presentaron buen aspecto y tamaño, caracterizándose por presentar hojas grandes y brillantes con tallos firmes y

vigorosos a diferencia de las plantas tratadas con BA y TDZ, en los cuales el crecimiento y desarrollo fue menor. Además de la baja respuesta organogénica (1,4 - 2,7 brotes/explante), los tratamientos con TDZ indujeron producción de callo y deformación de brotes, por lo que los mismos fueron descartados.

Fase de enraizamiento *in vitro*

La concentración de sacarosa utilizada en el medio de inducción de raíces afectó el proceso de rizogénesis en brotes de gerbera, manifestándose principalmente en la longitud de las mismas. Las

dos concentraciones de sacarosa estudiadas produjeron diferente respuesta en las tres variables de estudio, observándose que el incremento en la concentración mejoró ligeramente el enraizamiento, obteniéndose la mayor longitud de raíces (0,47 cm) con 40 g L⁻¹ (Cuadro 2). Esto permitió mayores oportunidades de sobrevivencia y aclimatación a las plantas con estas características. Sin embargo, se encontró que la formación de raíces en el medio con 40 g L⁻¹ se inició un poco más tarde (5,7 días) que en las plantas tratadas con 20 g L⁻¹ de sacarosa (4,8 días) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Respuesta organogénica durante el enraizamiento *in vitro* promedio de *Gerbera jamesonii* con dos concentraciones de sacarosa.

Sacarosa (g L ⁻¹)	I.F.R (Días)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
20	4,8 b	0,93 a	0,30 b
40	5,7 a	1,08 a	0,47 a
MDS	0,72	0,16	0,06

Medias con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey (p=0,05).
I.F.R= Inicio de formación de raíces.

Estos resultados guardan relación con lo observado por Koroch et al. (1997), quienes mencionan que al incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 0 a 45 g L⁻¹ aumentó el número de raíces en *Hedeoma multiflorum*. Asimismo, estos resultados coinciden con lo encontrado por Andrade y López (1994), quienes señalan que el incremento en la concentración de sacarosa causó un aumento en el número y longitud de raíces en gerbera. Sin embargo, en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) la respuesta fue a la inversa (Andrade, 1998). Al respecto, Edwin (1993), señala que la concentración de azúcar requerida depende del tipo y edad del material vegetal utilizado, ya que generalmente el crecimiento y desarrollo es directamente proporcional al incremento en la concentración de azúcar hasta alcanzar un punto óptimo después del cual hay una disminución.

Por otro lado, Galiba y Erdei (1986) mencionan que la concentración de sacarosa en el medio de cultivo es de suma importancia, ya que influye decisivamente no sólo en el crecimiento de las plantas, sino en la formación de cloroplastos y en la inducción de brotes, observándose que los cambios en la concentración de sacarosa producen alteraciones en el desarrollo de las plantas, los cuales afectan tanto su metabolismo

como las condiciones osmóticas del medio.

Fase de aclimatación de las plántulas

La aclimatación de las plantas de gerbera fue afectada en forma significativa por el efecto residual de los tratamientos usados durante la fase de inducción de brotes y enraizamiento *in vitro*, observando que en general, los tratamientos con cinetina dieron mejores resultados de sobrevivencia (86,7 - 92,5 %) en comparación con los de BA, especialmente en las provenientes de 2,2 µmolar (Cuadro 3). Esto indica que la calidad de las plantas producidas *in vitro* repercutió en su capacidad de aclimatación, pues como se señaló anteriormente, las producidas mediante el uso de cinetina presentaron mejores características cualitativas.

Las plantas que generaron el mayor número de hojas (5,1) fueron las provenientes del tratamiento con cinetina a 2,2 µmolar. Sin embargo, a mayor concentración de la hormona (4,4 µmolar) también se generó menor número de hojas (entre 3,9 y 4,5).

Se detectó un efecto variable sobre área foliar, peso fresco y peso seco, destacando que las plantas que recibieron cinetina presentaron un área foliar ligeramente superior y aquellas con BA 2,2 µmolar y 40 g L⁻¹ de sacarosa mostraron un

peso fresco muy alto. Sin embargo, no hubo concordancia entre este peso y el peso seco por lo que se atribuyó a fallas en la determinación.

En general, se observó que la cinetina produjo un efecto notable tanto en el porcentaje de supervivencia (89,4 % en promedio) como en las características de las plantas, las cuales presentaron aspecto y tamaño excelentes, caracterizadas por hojas grandes y brillantes, con tallos firmes y vigorosos, a diferencia de las plantas provenientes de tratamientos con BA en

las cuales el crecimiento y desarrollo fue menor.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado por Torrey (1976), referente a que el efecto residual de cinetina prolongó la supervivencia de plantas de *Xanthium* y mantuvo los niveles de proteína y clorofila en sus hojas. Esto probablemente fue debido a que las citocininas estimulan la síntesis de proteínas, por lo que pueden promover la maduración de los cloroplastos y retardar la senescencia de las hojas (Edwin, 1993).

Cuadro 3. Efecto residual de los tratamientos en la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de *Gerbera jamesonii* en invernadero.

Tratamientos residuales	Sobrevivencia (%)	Número de hojas	A.F (cm ²)	P.F (mg)	P.S (mg)
BA-2,2-Sac 20	75,0 c	4,88 ab	20,16 a	0,43 b	0,10 a
BA-2,2-Sac 40	75,0 c	4,91 ab	19,76 a	0,86 a	0,09 ab
BA-4,4-Sac 20	77,5 bc	4,83 ab	20,17 a	0,46 b	0,07 ab
BA-4,4-Sac 40	75,0 c	5,08 ab	18,79 a	0,39 b	0,05 b
CIN-2,2-Sac 20	90,0 ab	5,10 ab	25,57a	0,61 ab	0,09 a
CIN-2,2-Sac 40	92,5 a	5,12 a	22,42 a	0,45 b	0,05 b
CIN-4,4-Sac 20	88,3 abc	4,53 ab	23,33 a	0,46 b	0,09 ab
CIN-4,4-Sac 40	86,7 abc	3,90 b	18,13 a	0,45 b	0,08 ab

Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey (p=0,05). A.F.=Área foliar; P.F.=Peso fresco; P.S.=Peso seco; BA = Benciladenina; CIN = Cinetina.

Con respecto al efecto residual de la sacarosa en la etapa de aclimatación se observó que conforme se incrementó la concentración de la misma, la apariencia de las plantas fué mejor. Esto coincide con los resultados obtenidos por Langford y Wainwright (1987), quienes afirman que la sacarosa tiene un efecto favorable sobre las plántulas durante el período de aclimatación. De igual manera, Grout y Millan (1985) y Wainwright y Scrace (1989) señalan que el preacondicionamiento con alta concentración de azúcar incrementa la cantidad de carbohidratos almacenados en los brotes y aumenta también la energía disponible para plántulas con hojas formadas *in vitro* que actúan como órganos de

reserva de carbohidratos que servirán para desarrollar hojas más eficientemente fotosintéticas. Además, destacan que aunque este mecanismo no está bien definido la concentración de sacarosa y los tipos de carbohidratos durante el preacondicionamiento y enraizamiento *in vivo* de vitroplantas tienen una influencia significativa en la calidad de las plantas establecidas en invernadero.

Con respecto a los sustratos evaluados, se pudo observar que en general mostraron resultados similares, difiriendo en el número de hojas y en área foliar (Cuadro 4), indicando que la mezcla comercial es la que aparentemente aportó los mejores resultados.

Cuadro 4. Efecto del sustrato en la supervivencia, crecimiento y desarrollo de *Gerbera jamesonii*.

Sustrato	Sobrevivencia (%)	Número de hojas	A.F (cm ²)	P.F (mg)	P.S (mg)
M.Com	83,0 a	5,50 a	24,24 a	0,52 a	0,08 a
M.Lab	81,0 a	4,09 b	17,84 b	0,53 a	0,08 a
MDS	4,0	0,39	2,52	0,12	0,01

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey (p=0,05). A.F.=Área foliar; P.F.=Peso fresco; P.S.=Peso seco; M.Com= Mezcla comercial; M.Lab= Mezcla de laboratorio.

Por otra parte, el porcentaje de sobrevivencia durante esta etapa fue bueno ya que en general se

obtuvo un 82 %, lo cual indica que la aplicación de esta técnica en la propagación masiva de

plantas produjo resultados favorables al mantener una alta capacidad de éstas para sobrevivir al período de transición que ocurre desde las condiciones de cultivo *in vitro* hasta las de invernadero.

CONCLUSIONES

La mayor formación de brotes se logró utilizando 8,8 μ molar de BA (5,4 brotes/explante). Asimismo, el TDZ indujo más rápidamente la formación de brotes. Sin embargo, el número y calidad de los mismos fue baja, ya que en todas las concentraciones empleadas se observó deformación de brotes y hojas así como inducción de callo.

En la fase de enraizamiento *in vitro* la mejor concentración de sacarosa en el medio de cultivo fue 40 g L⁻¹, observándose que el incremento de su concentración mejoró la longitud de las raíces.

El efecto residual de los tratamientos con cinetina produjo los mejores resultados de sobrevivencia, con un promedio de 89,4%.

LITERATURA CITADA

- Andrade R., M. y M. C. López, P. 1994. Propagación *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii*). In: Memorias del 11° Congreso Latinoamericano de Genética y XV Congreso de Fitogenética. Monterrey Nuevo León. México. p. 260.
- Andrade R., M. 1998. Cultivo *in vitro* de tomate de cáscara. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México. 163 p.
- Edwin, F. G. 1993. Components of culture media. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. F. G. Edwin (ed.). Second Edition. Exetetics Limited. N. Y. pp. 322-326.
- Galiba, G. y L. Erdei. 1986. Dependence of wheat callus growth, differentiation and mineral content on carbohydrate supply. Plant Sci. 45: 65-70.
- Grout, B. W. W. y S. Millan. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. Bot. 55:129-131.
- Koroch, A. R., R. Juliani, Jr. H. Juliani R. y V. Trippi. 1997. Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48:213-217.
- Langford, P. J. y H. Wainwright. 1987. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. Ann. Bot. 60: 633-640.
- Murashige, T., M. Serpa y J. Jones. 1974. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. HortScience 9(3): 175-180.
- Pierik, R. L. M., M. H. Stegmans y J. J. Marelis. 1973. Gerbera plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. Sci. Hort. 1:117-119.
- Pierik, R. L. M., H. H. M. Steegmans., J. A. M. Verhaegh y A. N. Wouters. 1982. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* *in vitro*. Neth. J. Agric. Sci. 30: 341-346.
- Pierik, R. L. M., J. L. Jansen, A. Maasdam y C. M. Binnendijk. 1975. Optimalization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. Sci. Hort. 3: 351-357.
- Pierik, R. L. M. 1990. Preparación y composición del medio de cultivo. In: Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. 3a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 45-86.
- Torrey, J. G. 1976. Root hormones and plant growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 27: 435-459.
- Wainwright, H. y J. Scrace. 1989. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. Sci. Hort. 38:261-267.
- Zárraga S., C. y L. Granada C. 1990. Micropropagación *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii*). Boletín informativo de FIRA 216(22):14-20.