

## EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO *IN VITRO* Y LA FUENTE NITROGENADA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL COCUY (*Agave cocui* Trelease)

Marie González<sup>1</sup>, Norca Mogollón<sup>2</sup>, Geine Alvarado<sup>2</sup>, Aracelis Giménez<sup>1</sup> y Tarcisio Capote<sup>3</sup>

### RESUMEN

El cocuy (*Agave cocui* Trelease) es una especie que sirve de sustento económico a un gran número de familias en el semiárido del centroccidente y norte de Venezuela. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento de la planta a través de: A) Evaluación de los medios de Murashige y Skoog (MS) y Knudson (K), solos o modificados mediante la incorporación de una fuente amoniacal proveniente de sulfato de amonio o de urea, y de una fuente nítrica proveniente de nitrato de calcio, con ocho tratamientos, y B) Evaluación de la concentración de las sales de MS, con cuatro tratamientos, ¼ MS, ½ MS, ¾ MS y MS. A los seis meses de cultivo la acumulación de materia seca fue mayor en los brotes que crecieron en medio MS original en comparación con el K original. En general, hubo mayor crecimiento en el medio MS que en el K, mientras que el crecimiento fue menor en los medios con N amoniacal proveniente de sulfato de amonio. En los medios con fuente de N nítrica se observó mayor número de raíces. La mayor longitud de brotes, así como el menor número y longitud de raíces se registró en el medio MS completo, mientras que la concentración de azúcares reductores y totales tendió a aumentar a medida que disminuyó la fortaleza del medio MS. Dado que la planta presentó mayor crecimiento en medio MS que en K, y que hubo mayor crecimiento de raíces y acumulación de azúcar en el MS de baja concentración, se concluye que el medio ¼ MS podría ser muy útil para facilitar el proceso de aclimatización de los brotes enraizados de las plantas de cocuy.

**Palabras clave adicionales:** Amonio, nitrato, semiárido

### ABSTRACT

#### Effect of nitrogen source in the *in vitro* culture medium on growth of cocuy (*Agave cocui* Trelease)

The cocuy (*Agave cocui* Trelease) is a species that supports a large number of families in the semiarid area of Northwestern and Northern Venezuela. This study aimed to evaluate the effect of *in vitro* culture medium and nitrogen source on the plant growth through: A) Evaluation of the means of Murashige and Skoog (MS) and Knudson (K), alone or modified by incorporating a source of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (from ammonium sulfate or urea), and a source of N-NO<sub>3</sub> (from calcium nitrate), for a total of eight treatments, and B) Evaluation of the concentration of MS salts, with four treatments: ¼ MS, ½ MS, ¾ MS and MS full. After six months of cultivation, the dry matter accumulation was higher in the shoots grown in the original MS medium compared to the original K. Overall, there was larger growth in the MS medium than in K medium, while the growth was lowest in the media with N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> coming from ammonium sulfate. In the media with N-NO<sub>3</sub> there was a higher number of roots. The highest shoot length and the smallest number roots and root length were recorded in full MS medium, while the concentration of total and reducing sugars tended to increase as the strength of MS medium decreased. Since the plant had higher growth in MS medium than in K, and that there was more root growth and sugar accumulation in MS of low concentration. It is concluded that the ¼ MS could be very useful in facilitating the process of acclimatization of rooted shoots of cocuy plants.

**Additional key words:** Ammonium, nitrate, semiarid

### INTRODUCCIÓN

El cocuy (*Agave cocui* Trelease) es una planta que se encuentra de manera silvestre en la zona semiárida del centro-occidente de Venezuela, y

constituye el soporte económico de muchas familias por el empleo de las hojas para la obtención de fibra, la cual es usada en la elaboración de hamacas y otras artesanías, además de ser utilizado para la obtención de un licor que

Recibido: Octubre 5, 2010

Aceptado: Septiembre 8, 2011

<sup>1</sup> Programa de Ingeniería Agroindustrial, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".  
e-mail: marieg@ucla.edu.ve

<sup>2</sup> Posgrado de Horticultura. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".  
e-mail: norcam@inter.link.net.ve

<sup>3</sup> Dpto. Química y Suelos, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela

es muy apreciado en el mercado local.

En la nutrición mineral de esta planta, el nitrógeno es el principal nutriente que afecta el incremento del volumen de los brotes y la ganancia en peso de los tallos y hojas (Nobel, 1990). Este nutriente puede ser absorbido en las formas de nitrato o amonio. Cuando se absorbe como el primero de ellos, las plantas deben primero reducirlo a amonio, a un costo energético elevado, a diferencia del amonio, el cual una vez absorbido es metabolizado inmediatamente (Rabb y Terry, 1994). En el caso del nitrógeno que proviene de una fuente orgánica, como la urea, la absorción se produce principalmente en forma de amonio (Marschner, 1995).

El medio de cultivo más comúnmente usado en el cultivo de tejidos *in vitro* es el de Murashige y Skoog (1962), el cual presenta en su formulación la relación amonio:nitrato ( $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ) 1:2. Hay otros medios, como el de Knudson (1946), que han sido utilizados para la evaluación del crecimiento como respuesta a la nutrición nitrogenada (Mercier et al., 1997) cuya proporción amonio:nitrato se mantiene 1:2 pero que difiere en la fuente nitrogenada.

Existen numerosos reportes del efecto de la fuente nitrogenada sobre la morfogénesis de plantas *in vitro* y la respuesta varía incluso no sólo entre especies (Evans, 1993), sino entre cultivares de una misma especie (Ávila et al., 1998).

En vista de la importancia que revisten los aspectos nutricionales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y que existe un

conocimiento sobre el cultivo de tejidos *in vitro* de cocuy (Vargas et al., 1999; Salazar et al., 2009), el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la fuente nitrogenada en dos medios comunes de cultivo sobre el crecimiento de los explantes de *Agave cocui*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos. En el primero se evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno en los medios Murashige y Skoog (MS) y Knudson (K), y en el segundo se evaluaron diferentes concentraciones de las sales del medio MS.

- **Primer ensayo:** Se utilizaron los medios MS y K, modificados según el Cuadro 1. Para esto, se seleccionaron brotes de cocuy de 3,5 cm de longitud y 3,0 hojas en promedio provenientes del quinto subcultivo. Se utilizó un total de 240 frascos de 180 mL de capacidad, 30 por cada uno de los ocho tratamientos evaluados (Cuadro 1), en los cuales se dispensó 20 mL del medio de cultivo y se colocó una planta por envase. Se mantuvieron durante 6 meses en el medio con  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA +  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA, además de las vitaminas: tiamina de  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , ácido nicotínico  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y piridoxina  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , y sacarosa  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . El medio se solidificó mediante la adición de  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar. El pH fue ajustado a  $5,7\pm 0,1$ , y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. La temperatura fue de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas luz/día e intensidad luminosa de  $33,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Cuadro 1.** Formulación de los medios de cultivo K (Knudson, 1946) y MS (Murashige y Skoog, 1962) con las modificaciones realizadas para conformar los ocho tratamientos evaluados

Componentes	Tratamientos ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )							
	Medio K				Medio MS			
	Original	Amoniacal con urea	Amoniacal con sulfato	Nítrico	Original	Amoniacal con urea	Amoniacal con sulfato	Nítrico
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000			1893,6				
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500		1059,5			3965,4		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250	250	250	250	170	2727,4	2727,4	170
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250	250	250	370	370	370	370
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$		481,6				1802,5		
$\text{CaSO}_4$		576,4	576,4	515,5				
$\text{KNO}_3$					1900			6068,3
$\text{NH}_4\text{NO}_3$					1650			
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$					440	440	440	440

Para la formulación de los tratamientos se tomó como base los medios de MS y de K, en los que se modificó sólo la fuente nitrogenada

tratando de mantener las dosis de cada componente iguales a la formulación original.

Al final del período de evaluación se

determinaron las siguientes variables en diez plantas seleccionadas al azar de cada uno de los tratamientos: número de brotes generados por brote cultivado, número de hojas por brote cultivado, longitud promedio de brotes por planta, número de raíces, longitud de raíces por brote (promedio de las tres raíces de mayor longitud), masa fresca y masa seca; esta última se determinó después de colocar las plantas en estufa a temperatura de 65 °C hasta peso constante.

**- Segundo ensayo:** Brotes de cocuy de 3,2 cm de longitud y 4,4 hojas en promedio se colocaron (uno por frasco) en medio MS con fortaleza de ¼, ½, ¾ y MS completa. Se empleó el mismo contenido de reguladores en el medio y condiciones ambientales del ensayo anterior. Se utilizó un diseño completamente al azar con 50 frascos por tratamiento, y a los 5 meses se evaluaron las variables de crecimiento de las plantas. Asimismo, se determinó la concentración de azúcares reductores y totales; el contenido de clorofila a, b y total, y la relación clorofila a/b; y el contenido de nitrógeno total. Los azúcares reductores y totales se determinaron según metodología modificada propuesta por Ting (1956), considerando 100 mg de tejido foliar. Para determinar el contenido de clorofila se colectó la cuarta hoja desde la base, se maceraron 100 mg del tejido foliar con acetona 80 % buffer, y

luego de centrifugar se leyó el sobrenadante en espectrofotómetro Spectronic 21D a 663 y 645 nm, según la metodología propuesta por Kaul y Sabharwal (1971). El contenido de nitrógeno se determinó mediante el método de Kjeldahl luego de tomar al azar la parte aérea completa de diez plantas, las cuales conformaron una muestra compuesta única por tratamiento para su análisis.

Los resultados de cada variable en ambos ensayos fueron comparados mediante análisis de varianza usando el programa estadístico Statistix versión 8.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de los medios MS y K modificados

Se detectaron diferencias estadísticas entre los dos medios evaluados para todas las variables de crecimiento (Cuadro 2). Los brotes que crecieron en el medio MS completo presentaron, en general, mayores promedios que los del medio K completo, particularmente en la acumulación de materia seca ( $P \leq 0,05$ ). Puesto que ambos medios mantienen una proporción de 1:2 para la relación  $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ , es muy probable que la ventaja del MS sobre el medio K radique en el mayor contenido de nitrógeno total que posee en su formulación el primero de ellos.

**Cuadro 2.** Crecimiento de plantas de cocuy (*Agave cocui*) a los seis meses de cultivo en medios K y MS con diferentes fuentes de nitrógeno

Medio de cultivo	Nº brotes (1)	Nº hojas (1)	Longitud de brote (cm) (1)	Nº raíces (1)	Longitud de raíz (cm) (1)	Masa seca (g) (2)
K	1,3 bc <sup>(3)</sup>	4,2 abc	4,4 ab	6,8 a	2,2 ab	0,174 b
K amoniacal con urea	1,4 bc	2,7 bcd	2,6 c	3,9 ab	0,7 bc	0,063 c
K amoniacal con sulfato	1,2 bc	3,0 bc	4,6 ab	0,7 c	0,4 c	0,090 c
K nítrico	1,2 bc	3,1 bc	3,4 bc	5,6 a	0,9 bc	0,059 c
MS	3,9 ab	5,5 a	5,3 a	5,4 a	3,0 a	0,351 a
MS amoniacal con urea	6,4 a	2,4 cd	1,2 d	1,5 bc	0,4 c	0,168 b
MS amoniacal con sulfato	1,0 c	1,4 d	3,1 bc	1,2 bc	0,2 c	0,063 c
MS nítrico	1,1 c	4,5 ab	3,9 abc	6,2 a	2,9 a	0,206 b
C.V. (%)	32,25	15,64	13,88	29,79	27,05	20,48

<sup>(1)</sup> Promedios convertidos de  $Y = (x+1)^{1/2}$ ; <sup>(2)</sup> Promedios convertidos de  $Y = (x)^{1/2}$ . Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Los brotes que crecieron en los medios K y MS, ambos con sulfato de amonio, fueron los que presentaron el menor crecimiento reflejado en las variables evaluadas como una posible consecuencia de la acidificación del medio por la absorción de amonio, lo cual pudo afectar la absorción del resto de los nutrientes (Tolley-

Henry y Raper, 1986). Además los brotes se engrosaron en la base del tallo, las hojas más jóvenes se tornaron verde pálido y las más viejas murieron, sintomatología que pudiera atribuirse al exceso del ión amonio por acumulación del mismo en el tejido ante la incapacidad de ser metabolizado rápidamente (Britto y Kronzucker,

2002). Este efecto negativo sobre el crecimiento coincidió en parte con los resultados reportados por Sweby et al. (1994) en tabaco, donde el crecimiento de las plantas fue inhibido cuando se empleó sulfato de amonio como fuente amoniacal.

Un caso diferente se presentó cuando la urea fue utilizada como fuente amoniacal, ya que no hubo inhibición del crecimiento (Cuadro 2). La célula posee mecanismos que permiten la compartimentalización de la urea cuando está en exceso vía almacenamiento en la vacuola (Kojima et al., 2006), lo cual pudiera explicar los altos valores porcentuales de nitrógeno total encontrados en los medios K y MS, ambos con urea (Cuadro 3). En el caso del medio MS, la presencia de urea favoreció la proliferación de brotes, lo cual concuerda con investigaciones de Mercier et al. (1997), quienes hallaron mayor producción de brotes en dos especies de bromelias que crecieron en medios suplementados con urea.

En los medios con fuente de N nítrica (K y MS originales o los que recibieron dicha fuente) se encontró, en general, mayor longitud de brotes así como de número y longitud de raíces. Este resultado es contrario a lo observado por Zhang y Forde (2000) en *Arabidopsis* en la que hubo inhibición del crecimiento de raíces laterales y reducción en la longitud de las mismas en presencia de altos niveles de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

El contenido de N en las hojas presentó los valores más elevados en los medios con adición de urea (Cuadro 3). En tal sentido, Kojima et al. (2006) señalan que el tejido vegetal puede

acumular cierta cantidad de urea ya que la célula posee mecanismos para la compartimentalización de esta fuente de nitrógeno. Los niveles de nitrógeno foliar fueron moderados en los medios con N-nítrico, y bajos en los medios con N-amoniacal proveniente de sulfato de amonio, lo cual es posible que se deba a la poca asimilación del nitrógeno bajo esta forma amoniacal.

**Cuadro 3.** Contenido de nitrógeno en hojas de cocuy (*Agave cocui*) a los seis meses de cultivo en medios K y MS con diferentes fuentes del elemento

Medio de cultivo	N (%)
K	2,75
K amoniacal con urea	4,93
K amoniacal con sulfato	1,65
K nítrico	3,64
MS	4,48
MS amoniacal con urea	4,53
MS amoniacal con sulfato	1,96
MS nítrico	3,27

#### Evaluación de la concentración de las sales de MS

Las diferentes concentraciones del medio MS produjeron diferencias estadísticas en la longitud de los brotes y en la longitud y número de raíces (Cuadro 4). No se detectaron diferencias en el número de brotes, número de hojas y masa seca; en el caso particular del número de brotes, esto podría atribuirse a la alta variabilidad que se observó en los resultados de dicha variable.

**Cuadro 4.** Crecimiento de plantas de cocuy (*Agave cocui*) a los cinco meses de cultivo en medio MS con diferentes concentraciones

Medio de cultivo	Número de brotes <sup>(1)</sup>	Longitud de brote (cm) <sup>(2)</sup>	Número de hojas <sup>(2)</sup>	Número de raíces <sup>(1)</sup>	Longitud de raíz (cm) <sup>(1)</sup>	Masa seca (g) <sup>(2)</sup>
¼ MS	4,6 a	2,4 b	4,6 a	12,5 a	3,2 a	0,181 a
½ MS	4,4 a	2,4 b	4,2 a	11,2 a	2,3 ab	0,141 a
¾ MS	3,4 a	3,2 b	4,6 a	11,9 a	2,8 ab	0,125 a
MS	1,7 a	5,0 a	4,0 a	2,9 b	1,1 b	0,130 a
C.V. (%)	33,75	20,34	13,95	37,0	23,83	25,4

<sup>(1)</sup> Promedios convertidos de  $Y = (x+1)^{1/2}$ ; <sup>(2)</sup> Promedios convertidos de  $Y = (x)^{1/2}$ . Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

La mayor longitud de brotes se registró en el medio MS completo, a diferencia de los resultados de Evans (1993) y Ávila et al. (1998), quienes encontraron plantas de mayor longitud, con entrenudos más largos en *Solanum tuberosum* cuando redujeron el contenido de nitrógeno en la

formulación del medio MS.

El número de raíces desarrolladas y su longitud tendieron a disminuir a medida que el medio contenía mayor concentración de nitrógeno, y fueron siempre menores en el medio MS completo.

Se pudo observar en los brotes que crecieron en el medio MS un predominio del crecimiento de la parte aérea sobre la parte radical, a diferencia de los medios donde las concentraciones de las sales de MS fueron menores.

La concentración de azúcares reductores y totales tendió a aumentar a medida que disminuyó la fortaleza del medio MS (Cuadro 5), con

diferencias estadísticas al comparar el tratamiento  $\frac{1}{4}$  MS con el MS completo. Estos resultados coinciden con los reportados por Sabino et al. (2003) en caña de azúcar y se atribuyó a que en el medio más concentrado, como es el MS completo, los azúcares son utilizados en la asimilación del nitrógeno y se encuentran en menor proporción debido a su metabolización.

**Cuadro 5.** Concentración de azúcares y fracciones de clorofila en plantas de cocuy (*Agave cocui*) a los cinco meses de cultivo en medio MS con diferentes concentraciones

Medio de cultivo	Azúcares reductores	Azúcares totales	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Relación Clorofila a/b
$\frac{1}{4}$ MS	1,6275 a	2,2108 a	2,85 a	1,25 a	3,68 a	2,30 a
$\frac{1}{2}$ MS	1,3198 ab	1,8573 ab	2,88 a	1,34 a	3,79 a	2,15 ab
$\frac{3}{4}$ MS	1,3313 ab	1,9494 ab	2,78 a	1,30 a	3,67 a	2,13 b
MS	1,0003 b	1,4994 b	2,64 a	1,24 a	3,49 a	2,14 ab
C.V. (%)	23,9	24,6	23,7	23,7	23,6	4,4

Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Un aspecto que podría utilizarse para facilitar la aclimatización posterior de las plantas de cocuy es la utilización del medio  $\frac{1}{4}$  MS en la fase de multiplicación, pues al poseer los brotes enraizados mayor cantidad de azúcares tendrían una cantidad de reservas importante que le permitirían hacer uso de las mismas mientras el proceso de adaptación se va cumpliendo y se regulariza el proceso fotosintético, según lo observado por Valero-Aracama et al. (2006).

El contenido de clorofila en los brotes que crecieron en los medios evaluados no presentó diferencias entre los diferentes tratamientos (Cuadro 5). En cuanto a la relación clorofila a/b se observó el mayor valor en el tratamiento  $\frac{1}{4}$  MS, coincidiendo con los resultados obtenidos en trigo por Kumari (2011) quien señaló que la relación fue alta cuando disminuyó la suplencia de nitrógeno en el medio.

## CONCLUSIONES

El medio original de MS permitió la mayor acumulación de materia seca en los brotes de cocuy (*Agave cocui*), y en general tendió a superar al medio K para las variables número de hojas por brote, longitud del brote, número y longitud de raíces.

Cuando se utilizó nitrógeno amoniacal a partir de urea en el medio MS las plantas acumularon

mayor concentración de nitrógeno en las hojas y desarrollaron la mayor cantidad de brotes, llegando alcanzar 6,4 brotes por brote cultivado, mientras que el crecimiento fue menor en los medios con N amoniacal proveniente de sulfato de amonio. Por otra parte, cuando se utilizó nitrógeno nítrico se observó que fue mayor el número de raíces por brote cultivado.

Con respecto a la concentración del medio MS, se encontró que en su forma completa hubo menor número y longitud de raíces, mientras que a su concentración más baja ( $\frac{1}{4}$  MS) hubo incremento del contenido de azúcares reductores y totales. Considerando lo anterior, el medio MS a un cuarto de su concentración se presenta como un medio de cultivo con gran posibilidad de ser utilizado para la multiplicación del cocuy.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" por el financiamiento a esta investigación.

## LITERATURA CITADA

1. Ávila, A. de L., S. Pereyra y J. Arguello. 1998. Nitrogen concentration and proportion of  $\text{NH}_4^+$ -N affect potato cultivar response in solid

- and liquid media. HortScience 33(2): 336-338.
2. Britto, D. y H. Kronzucker. 2002.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review J. Plant Physiol. 159: 567-584.
  3. Evans, N. 1993. A preliminary study on the effects of nitrogen supply on the growth *in vitro* of nine potato genotypes (*Solanum* spp.). Journal of Experimental Botany 44(261): 837-841.
  4. Kaul, K. y P. Sabharwal. 1971. Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 47: 691-695.
  5. Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. AOS Bull. 15: 214-217.
  6. Kojima, S., A. Bohner y N. von Wirén. 2006. Molecular mechanisms of urea transport in plants. J. Membrane Biol. 212: 83-91.
  7. Kumari, S. 2011. Yield response of unicult wheat (*Triticum aestivum* L.) to early and late application of nitrogen: flag leaf development and senescence. Journal of Agricultura Science 3(1): 170-182.
  8. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press. London.
  9. Mercier, H., G. Kerbauy, B. Sotta y E. Miginiac. 1997. Effects of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and urea nutrition on endogenous levels of IAA and tour cytokinins in two epiphytic bromeliads. Plant, Cell and Environment 20: 387-392.
  10. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
  11. Nobel, P. 1990. Enviromental influences on  $\text{CO}_2$  uptake by Agaves, Cam plants with high productivities. Economic Botany 44(4): 488-502.
  12. Raab, T.K. y N. Terry. 1994. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. Plant Physiology 105: 1159-1166.
  13. Sabino, V., A. de Andrade, E. de Souza y J. de França. 2003. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. Pesq. Agrop. Bras. 38(12): 1373-1379.
  14. Salazar, E., P. González y C. Hernández. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. Agronomía Trop. 59(2): 129-135.
  15. Sweby, D., B. Hockett y M. Watt. 1994. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun *in vitro* plantlets. Journal of Experimental Botany 45 (276): 995-1008.
  16. Ting, S.V. 1956. Rapid colormetric method for simultaneous determinations of total reducing sugar. Agric. and Food Chemistry 4(3): 263-266.
  17. Tolley-Henry, L. y C. Raper. 1986. Utilization of ammonium as a nitrogen source. Plant Physiol. 82: 54-60.
  18. Valero-Aracama, C., M. Kane, S. Wilson, J. Vu, J. Anderson y N. Philman. 2006. Photosynthetic and carbohydrate status of easy-and difficult-to-acclimate sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes during *in vitro* culture and *ex vitro* acclimatization. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 42: 572-583.
  19. Vargas, T., L. Yépez, M. Oropeza y E. de García. 1999. Propagación *in vitro* de especies xerófitas de interés comercial. Memorias del Instituto de Biología Experimental 2: 127-130.
  20. Zhang, H., y B. Forde. 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. Journal of Experimental Botany 51: 51-59.