



# Establecimiento de un método eficiente de estandarización de la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* (Moringaceae)

## Establishment of an efficient standardization method of *in vitro* germination of *Moringa oleifera* (Moringaceae)

Claudia Verónica Luna<sup>1,2,3</sup> 

### Resumen:

**Antecedentes y Objetivos:** *Moringa oleifera* es fuente de fitoquímicos con aplicación potencial en medicamentos. Su uso medicinal, sobre todo de las hojas, es reconocido mundialmente; se les atribuye la presencia de compuestos bioactivos funcionales. El objetivo de este trabajo fue estandarizar la germinación *in vitro* de *M. oleifera* en biorreactores de inmersión temporal utilizando distintos medios de cultivo.

**Métodos:** Las semillas se sembraron con y sin testa, en medios basales líquidos compuestos de agua (control) y sales de Murashige y Skoog (MS) en su concentración original o diluido al 50 y 25%, con 0, 15 y 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa. Se evaluaron los porcentajes de germinación, indicadores de vigor y crecimiento en plántulas.

**Resultados clave:** En las semillas con testa se obtuvo un 23.33±5.77% de germinación en un solo tratamiento sin lograr evaluar los parámetros propuestos. Se complementaron estos resultados con la prueba de viabilidad de tetrazolio de las semillas no germinadas, registrando un 34.16±18.73% de viabilidad. La remoción de la testa y medio de cultivo líquido favorecieron la germinación. El mayor porcentaje de germinación, capacidad germinativa y coeficiente de uniformidad, así como mayor desarrollo foliar, relación de biomasa aérea y radical, incremento de peso seco de material vegetal por unidad de tiempo, al igual que la acumulación de masa seca, se obtuvieron con MS como medio basal.

**Conclusiones:** Para la estandarización de la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* se recomienda la remoción de la testa y la utilización de MS como medio basal, ya que aceleran el proceso y posibilitan obtener plántulas que podrán ser utilizadas para experimentos de regeneración indirecta y/o directa para un escalado masivo de germoplasma.

**Palabras clave:** biomasa, biorreactores de inmersión temporal, marango, plántulas, semillas.

### Abstract:

**Background and Aims:** *Moringa oleifera* is a source of phytochemicals with potential applications in medicine. The medicinal use of its leaves is recognized worldwide, to which the presence of functional bioactive compounds is attributed. This work aimed to standardize a protocol for *in vitro* germination of *M. oleifera* in temporary immersion bioreactors, using different culture media.

**Methods:** The seeds were sown with and without seed coat, in liquid basal media composed of water (control) and salts of Murashige and Skoog (MS) in their original concentration or diluted to 50% and 25%, with 0, 15 and 30 g l<sup>-1</sup> sucrose. Germination percentage, indicators of vigor and growth in seedlings were evaluated.

**Key results:** In seeds with seed coat, 23.33±5.77% germination was obtained in a single treatment, without being able to evaluate the proposed parameters. These results were complemented with the tetrazolium viability test of the ungerminated seeds, registering a 34.16±18.73% viability. The removal of the seed coat and liquid culture medium favored germination. The highest percentage of germination, germination capacity and coefficient of uniformity, as well as greater leaf development, ratio of aerial and root biomass, increase of dry weight of plant material per unit of time, and the accumulation of dry matter, were obtained with MS as a basal medium.

**Conclusions:** For the standardization of germination *in vitro* of *Moringa oleifera* it is recommended to remove the seed coat and to use MS as a basal medium, since they accelerate the process and make it possible to obtain seedlings that can be used for experiments of indirect and / or direct regeneration for a massive escalation of germplasm.

**Key words:** biomass, marango, seedlings, seeds, temporary immersion bioreactors.

1 Universidad Nacional del Nordeste, Cátedra de Silvicultura-Facultad de Ciencias Agrarias, Sgto. Cabral 2131, Corrientes Capital, Argentina.

2 Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Sgto. Cabral 2131, Corrientes Capital, Argentina.

3 Autor para la correspondencia: [claudiaverluna@gmail.com](mailto:claudiaverluna@gmail.com)

Recibido: 18 de diciembre de 2018.

Revisado: 4 de marzo de 2019.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 20 de marzo de 2019.

Publicado Primero en línea: 10 de abril de 2019.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 126 (2019).

Citar como:

Luna, C. 2019. Establecimiento de un método eficiente de estandarización de la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* (Moringaceae). Acta Botanica Mexicana 126: e1496. DOI: [10.21829/abm126.2019.1496](https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1496)



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 International).

e-ISSN: 2448-7589

## Introducción

*Moringa oleifera* Lam. es nativa de las zonas sub-Himalaya de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán (Shahzad et al., 2013). Es la especie más utilizada de la familia Morinaceae (Steinitz et al., 2009). Es fuente de fitoquímicos con aplicación potencial en medicamentos, preparaciones funcionales de alimentos (Agramonte et al., 2014), purificación de agua y producción de biodiesel (Villarreal Gómez y Ortega Angulo, 2014). El uso medicinal de sus hojas, sobre todo, es reconocido mundialmente; se les atribuye la presencia de compuestos bioactivos funcionales (Saini et al., 2016; Fernández Sobrados et al., 2018).

Entre sus múltiples propiedades biológicas destacan su actividad anticancerígena, hepatoprotector, antiinflamatorio, antiarterosclerótico, protector oxidativo de los daños en el ADN, cardioprotector (Olson y Fahey, 2011; Canett Romero et al., 2016), así como nutracéutico en especial por su aporte de calcio, hierro, vitamina C y carotenoides (Bolarinwa, 2017). Debido a esta potencialidad en su uso, su cultivo se ha incrementado en los últimos años (Martín et al., 2013; Matos Ruiz et al., 2016). A pesar de todas sus bondades, es una especie subutilizada aún en su lugar de origen y, por consiguiente, el germoplasma es escaso (Shahzad et al., 2014).

*Moringa oleifera* tradicionalmente se propaga por semillas (Salem, 2016), pero su germinación es muy baja; varios autores han descrito su micropropagación además de semillas, a partir de segmentos nodales (Steinitz et al., 2009; Agramonte et al., 2014; Matos Ruiz et al., 2016). La alternativa más viable es la propagación vegetativa a través de estacas que, en última instancia, pueden causar la muerte de las plantas madre (Shahzad et al., 2014). En este sentido, con el objetivo de asegurar el mantenimiento de germoplasma y propagación rápida, se han desarrollado técnicas de cultivo *in vitro* para *Moringa oleifera*. Sin embargo, aún es escasa la información en relación a la importancia que representa la especie para su uso a nivel agrícola y médico.

Para la propagación *in vitro* de muchas especies se han utilizado con éxito los biorreactores de inmersión temporal (BIT®) (Watt, 2012). Con estos sistemas se han logrado obtener mejoras significativas en los indicadores morfofisiológicos de los brotes que garantizan mayor su-

pervivencia y crecimiento, de los mismos, en condiciones *ex vitro* (Aragón et al., 2011).

Para el análisis de las semillas de moringa, aún no está estandarizado un test de germinación; solo existen escasos estudios relacionados con las condiciones óptimas de luz, temperatura y sustrato para su germinación (Navarro et al., 2015). El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar un protocolo para la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal, para acelerar el proceso y obtener plántulas que podrán ser utilizadas para experimentos de regeneración indirecta y/o directa para un escalado masivo de germoplasma.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal y esterilización de las semillas

Se utilizaron semillas de diversos árboles de moringa, sanas y uniformes, cosechadas en febrero de 2017 en el departamento Capital de la Provincia de Corrientes, Argentina (27°28'09.8"S y 58°50'27.1"W) y almacenadas durante tres meses a 4 °C en bolsas de papel hasta el momento del ensayo.

Las semillas extraídas de los frutos fueron esterilizadas en superficie dentro del equipo de flujo laminar horizontal (CASIBA HL2A®, Buenos Aires, Argentina) por inmersión en una solución de etanol (70%) durante 1 min, transferidas luego a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) en una concentración de 2.5% cloro activo y Triton® (0.1%) durante 30 min en agitación constante (90 r.p.m.). Una vez finalizado el tratamiento de desinfección, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril.

### Germinación de semillas

La germinación de las semillas se evaluó en simientes con y sin testa. La remoción del tegumento seminal se realizó sobre las semillas desinfectadas de forma manual, utilizando guantes de examinación (Nitrilo sin polvo) para mantener la asepsia.

Se evaluaron seis diferentes medios basales líquidos, compuestos de agua (como control) y sales de Murashige y Skoog en su concentración original, al 50 y 25%, complementados además con 0, 15 y 30 g l<sup>-1</sup> sacarosa según el caso (Cuadro 1). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.8

**Cuadro 1:** Medios de cultivo evaluados durante la germinación *in vitro* de semillas de *Moringa oleifera* Lam. MS: Murashige y Skoog (1962).

Medios de cultivos (M)	Composición
M1	agua
M2	agua + 15 g l <sup>-1</sup> de sacarosa
M3	agua + 30 g l <sup>-1</sup> de sacarosa
M4	Sales de MS: concentración completa + 30 g l <sup>-1</sup> de sacarosa
M5	Sales de MS: 50% de la concentración + 30 g l <sup>-1</sup> de sacarosa
M6	Sales de MS: 25% de la concentración + 30 g l <sup>-1</sup> de sacarosa

con KOH o HCl y luego se les esterilizó por calor húmedo (121 °C) mediante autoclave (Pasteur SRL, modelo Alfax 40×60, capacidad 75 l, Buenos Aires, Argentina) a 1.46 kg cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos.

Se cultivaron diez semillas por tratamiento en biorreactores de inmersión temporal (BIT) desarrollados artesanalmente (Fig. 1), que constan de dos recipientes interconectados por un tubo (constituyendo una unidad). Uno de ellos contiene el medio de cultivo, mientras que el otro alberga los explantes. Al aplicarse presión, el medio de cultivo asciende y cruza a través del tubo conector al otro recipiente. Cada biorreactor contó con 100 ml de volumen de medio basal. Se utilizó una frecuencia de cuatro horas y un tiempo de inmersión de un minuto. Los cultivos fueron incubados durante 21 días en condiciones de luz (116 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PAR, fotoperíodo 14 h) y temperatura (27±2 °C) controladas. Los cultivos de semillas con testa fueron mantenidos en incubación hasta observarse su germinación, que se alcanzó aproximadamente a los 45 días.

Por el antecedente de Steinitz et al. (2009), de contaminación bacteriana endógena en el cultivo *in vitro* de semillas de *M. oleifera*, a los medios de cultivo de los biorreactores de inmersión temporal, se les adicionó un biocida (0.75 ml l<sup>-1</sup> de Delcide™ TG: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one+2-methyl-4-isothiazolin-3-one, 1.05 y 0.45%) para obtener un cultivo aséptico durante la ejecución del experimento (Luna et al., 2013).

Se registró el número de semillas germinadas cada tres días durante 21 días. Al finalizar el ensayo se evaluó el porcentaje de germinación (PG%), cuyos resultados se expresaron en porcentaje y número de semillas germinadas acumuladas o germinación acumulada. Para conocer con

mayor detalle diferentes características del proceso de germinación se evaluaron algunos indicadores:

Índice de velocidad de germinación (IVG), se determinó a partir del empleo de la siguiente fórmula:

$$IVG = \sum Ci / \sum CiTi$$

Donde  $C_i$  representa el número de semillas germinadas por día y  $T_i$  el número de días transcurridos desde el inicio del ensayo en que germinan  $C_i$  semillas.

El tiempo medio de germinación (TMG) se calculó a partir del IVG mediante la ecuación:

$$TMG = \sum CiTi / \sum Ci$$

La capacidad de germinación (CG%) y el porcentaje de plántulas normales se han evaluado a los 12 días de incubación (Bekendam, 1980). Llámese plántulas normales a las que poseen las estructuras esenciales que son indicativas de su habilidad para producir una planta normal bajo condiciones favorables. Estas plántulas poseen un brote normal y sano (hipocótilo, cotiledones o epicótilo) y una raíz (primaria y secundaria) (FAO, 2011). El coeficiente de uniformidad ( $C_u$ ) es definido por la ecuación:

$$C_u = \sum [Ni / \sum (TMG - Di)^2 * Ni] * 10^2$$

Donde  $N_i$  es el número de semillas germinadas el día  $D_i$ ;  $D_i$  es el número de días transcurridos desde su cultivo. Para fines prácticos, se consideró una semilla germinada a aquella que exteriorizaba el par de cotiledones y/o una raíz de no menos de 5 mm de longitud.

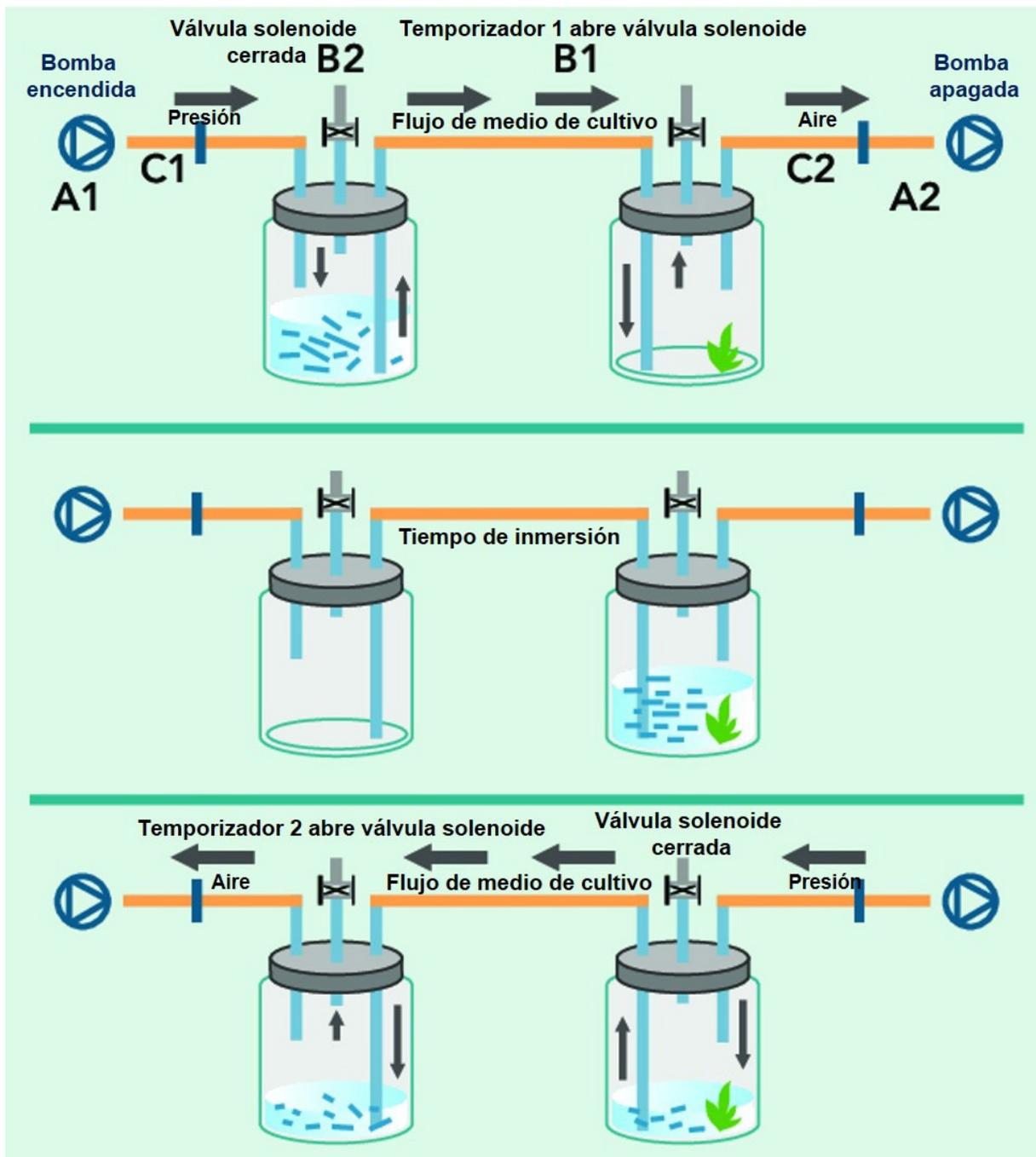


Figura 1: Biorreactor de inmersión temporal BIT. Adaptado de Monroy Álvarez y Filgueira Duarte, 2010.

Para el análisis de crecimiento de plantas se evaluó lo siguiente:

La tasa de crecimiento absoluto (AGR (Absolute Growth Rate)),  $g\ día^{-1}$  de una planta u órgano para cualquier instante de tiempo (t); AGR se define como el incremento de masa seca de material vegetal (dW) por unidad de tiempo:

$$AGR: dW/dt$$

La relación raíz:parte aérea (R:S (root:shoot ratio)) se calcula a partir de los pesos de raíces, tallos, pecíolos y hojas. La relación parte aérea: raíz (S:R) es la inversa de la anterior; es empleada en ciertas ocasiones.

La proporción de raíz (RMF (Root Mass Fraction)) representa la relación entre la biomasa del sistema radical y la biomasa total de la planta; se expresa en g (raíz) g<sup>-1</sup> (planta).

La proporción de parte aérea (LMF (Leaf Mass Fraction)) cuantifica la relación entre la biomasa de la parte aérea y la biomasa total de la planta; se expresa en g (parte aérea) g<sup>-1</sup> (planta) (Di Benedetto y Tognetti, 2016).

Los índices anteriormente descritos se calcularon a partir del registro de 1) biomasa fresca de tallo o peso fresco parte aérea (PFA), raíz (PFR) y total (PFT); para ello se realizó la extracción de las plántulas del medio con una pinza y se pesaron en una balanza analítica (WANT, modelo FA2004H, Jiangsu, China); 2) biomasa seca de tallo (PSA), raíz (PSR), total (PST) y su relación biomasa seca tallo y raíz (RBSA/BSR), para lo cual la biomasa fresca se colocó en una estufa (BIOELEC, modelo 2, Buenos Aires, Argentina) a 62° C durante 72 h, y 3) cálculo de parámetros biométricos para evaluar crecimiento como longitud de tallo (LA) y raíz (LR), número de hojas y masa seca por plántula (MS) en g.

### Pruebas de viabilidad

A modo de complementariedad de los resultados del ensayo de semillas con testa, se realizó la prueba topográfica por tetrazolio, para evaluar viabilidad de las simientes cultivadas en los biorreactores y que no germinaron durante el ensayo. El mismo se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio. Se acondicionaron las semillas realizando sumersión en la solución de tetrazolio para su tinción utilizando frascos de vidrio de 100 ml con tapa hermética. Se incubaron en estufa (DALVO, modelo TDE/70, Buenos Aires, Argentina) a 28 °C y en oscuridad durante 24 h. Una vez cumplida la tinción, las semillas se enjuagaron con abundante agua corriente y se realizaron observaciones individuales sobre cada semilla disectada. Se utilizó el patrón de clasificación de viabilidad adaptado de Fogaça et al. (2006). Las variables se expresaron en porcentajes.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se evaluó la prueba topográfica por tetrazolio sobre la muestra de semillas, con testa o tegumento, visualmente

identificada como sana, pero sin germinar en cada uno de los medios de cultivo ensayados. Todos los parámetros fueron evaluados estadísticamente con un diseño completamente aleatorizado donde se cultivaron diez semillas por tratamiento (medio de cultivo) y por biorreactor. Cada biorreactor representa una unidad experimental, se efectuaron tres repeticiones del experimento. Se realizó análisis de la varianza sobre los datos y las medias fueron comparadas entre sí por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar el grado de significancia entre los distintos tratamientos, por medio del software InfoStat (Di Rienzo et al., 2011).

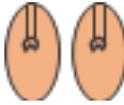
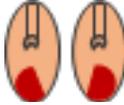
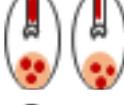
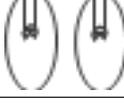
## Resultados

Las semillas con testa cultivadas en los biorreactores de inmersión temporal fueron monitoreadas hasta observar el inicio de germinación que se produjo a los 45 días de incubación. Al momento el M2 (agua+15 g l<sup>-1</sup> sacarosa) fue el único tratamiento que desencadenó el proceso en 23.33±5.77%. Por ello no se ha logrado evaluar los parámetros de vigor propuestos. Al realizar la prueba de viabilidad de tetrazolio sobre las semillas no germinadas durante el experimento se registró que luego del tiempo de incubación solo 34.16±18.73% de las semillas aún se encontraba viable (Cuadro 2).

La germinación de las semillas sin testa o tegumento cultivadas en los biorreactores de inmersión temporal inició en menor tiempo (tercer día) en aquellos tratamientos cuyo medio basal fue el agua con o sin el agregado de sacarosa. Para el M1 (agua) y M2 (agua+15 g l<sup>-1</sup> sacarosa) con 23.33 y 15% respectivamente (Fig. 2), alcanzó su máximo valor (66.66±5.77%) en M1 (agua) a los nueve días de incubación. El M5 (MS: 50%+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) fue el tratamiento con mayor registro de germinación (80±10%) y se inició a los seis días.

El porcentaje de germinación (PG) registrado (Cuadro 3), si bien no presenta diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo ensayados, manifiesta que la remoción del tegumento muestra efectos significativos en el proceso. Se registraron valores que variaron entre 60±10 y 80±10%. El índice de velocidad de germinación (IVG) varió de 1.78±0.3 a 3.92±0.34 semillas germinadas por día, obteniéndose este último valor con el tratamiento M1 (agua)

**Cuadro 2:** Patrón de clasificación de viabilidad de semillas de *Moringa oleifera* Lam.: descripción de las clases para la prueba de tetrazolio y porcentajes para cada una de ellas (Adaptado de Fogaça et al., 2006, atendiendo la licencia Creative Commons CC By-NC 4.0).

Categoría	Descripción	Patrón de clasificación de viabilidad	Resultados obtenidos (%)
Clase 1	<b>Viable:</b> semilla con coloración rosa uniforme y todos los tejidos con aspecto normal y firme.		25.11±8.73
Clase 2	<b>Viable:</b> semillas que presentan menos de 50% de los cotiledones con coloración rojo intenso, típico de tejido en deterioro.		6.8±8.70
Clase 3	<b>Viable:</b> extremidad de la radícula con coloración blanco lechoso sin llegar al cilindro central, además de presentar manchas de color blanco lechoso y dispersas de color rojo intenso.		0
Clase 4	<b>Viable:</b> semillas que presentan menos de 50% de la región cotiledonar con coloración blanco lechoso, caracterizando tejido muerto.		2.25±4.5
Clase 5	<b>Inviable:</b> eje embrionario y más del 50% de la región cotiledonar que presente coloración roja intensa típica de tejidos en deterioro.		27.2±22.20
Clase 6	<b>Inviable:</b> semilla totalmente con coloración rojo intenso, indicando grave proceso de deterioro.		20.4±8.70
Clase 7	<b>Inviable:</b> eje embrionario con coloración blanco lechoso, que presente el cilindro central con coloración rojo intenso. Región cotiledonar que presente más del 50% blanco lechoso, con manchas rojas intensas dispersas.		11.3±4.6
Clase 8	<b>Inviable:</b> semilla totalmente con coloración blanco lechoso que presente tejidos flácidos.		4.5±5.19
Promedio de semillas viables			34.16±18.73

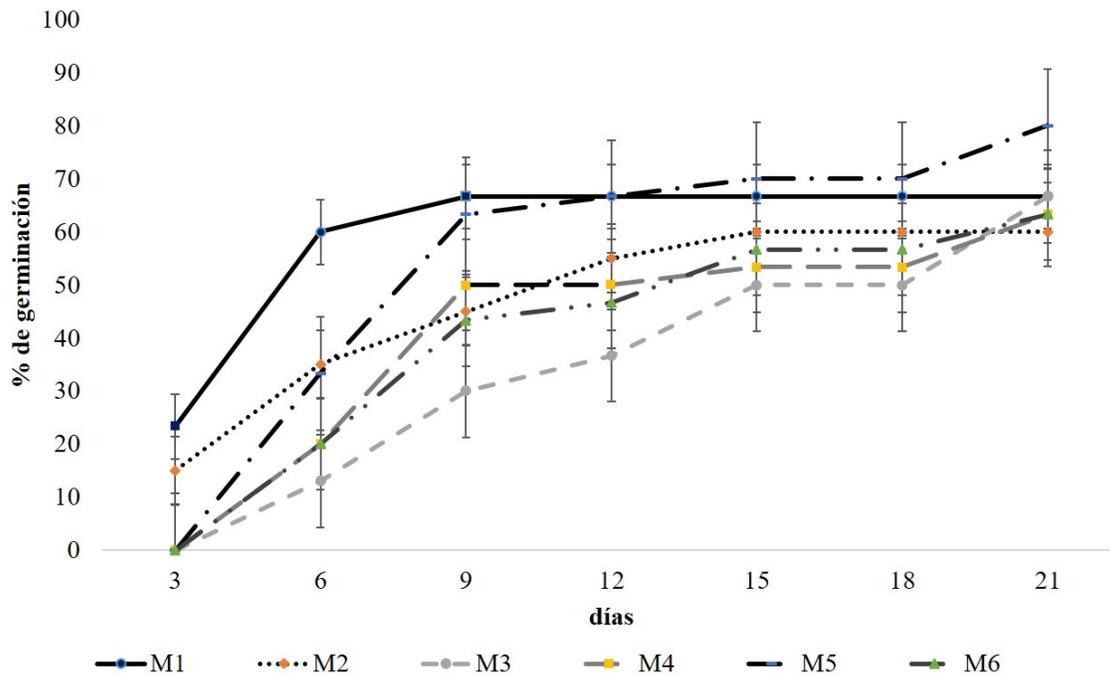
(Cuadro 3). Para la variable tiempo medio de germinación (TMG) se observó que el medio basal utilizado incide directamente en el tiempo necesario para que germinen las semillas, siendo diferentes significativamente los medios de cultivo compuestos por agua de los compuestos por MS (Cuadro 3). Por su parte el M1 (agua) fue el tratamiento que registró el menor tiempo requerido para el proceso en cuestión (13.02±0.39 días).

La capacidad germinativa (CG) fue similar para los tratamientos M1 (agua) y M5 (MS: 50%+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) (66.67±5.3%), independientemente de la composición del medio basal. Si bien no se han encontrado diferencias significativas en el coeficiente de uniformidad de la germinación (CU) entre los diferentes medios de cultivo, se desta-

ca el M5 (MS: 50%+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) con el mayor valor (0.91±0.07) (Cuadro 3; Fig. 3A).

En cuanto al análisis del crecimiento de las plántulas, el número de hojas de las plantas obtenidas durante los 21 días varió entre 0.67±0.36 (M3: agua+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) y 3.73±0.74 (M4: MS concentración completa+30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa), observándose diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual permitió determinar como el mejor tratamiento para el desarrollo foliar a este último (M4) (Figs. 3B, C).

Para los parámetros longitud del tallo y raíz no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 4). En estudios realizados por Medina et al. (2007), a partir de los 20 días de sembradas en macetas, los tratamientos de remojo en agua por 24 horas registra-



**Figura 2:** Germinación acumulada de semillas de *Moringa oleifera* Lam. La barra indica el error estándar de la media de tres repeticiones independientes. M1, M2, M3, etc. corresponden al número de tratamiento.

**Cuadro 3:** Indicadores de vigor en la germinación de semillas de *Moringa oleifera* Lam. en condiciones *in vitro*. PG: poder germinativo; IVG: índice de velocidad de germinación; TMG: tiempo medio de germinación; CG: capacidad de germinación en %; CU: coeficiente de germinación. En una misma fila se comparan diferentes medios de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (medios de cultivo) ( $p \leq 0.05$ , Test de comparaciones múltiples de Tukey).

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
PG%	66.66±5.8a	60±10a	66.66±25.2a	66.66±9.8a	80±10a	70±7.4a
IVG	3.92±0.3a	3.05±0.4ab	1.78±0.3b	2.25±0.3b	2.93±0.3ab	2.19±0.3b
TMG (días)	13.02±0.3b	14.30±0.4ab	15.53±0.3a	14.56±0.4ab	14.53±0.4ab	14.88±0.4ab
CG%	66.67±5.3a	55.00±6.5ab	36.67±5.3b	50±5.3ab	66.67±5.3a	46.67±5.3ab
CU	0.26±0.43a	0.80±0.14a	0.86±0.33a	0.75±0.28a	0.91±0.07a	0.77±0.12a

ron una longitud del tallo de 10.7-11.2 cm y de la raíz de 3.4-3.9 cm; no difiriendo mucho con los resultados obtenidos en este estudio con el M1 (agua), donde se registró 7.09±1.7 cm para tallo y con el M5 (MS: 50%+30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa) 3±1.17 cm para raíz en condiciones *in vitro*.

El peso fresco de la parte aérea (PFA) varió entre 0.12±0.03 (M3: agua+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) y 0.38±0.07 g (M4: MS concentración completa+30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa) (Cuadro 4), mientras que el peso seco de la parte aérea (PSA) se registró entre 0.004±0.0006 (M3) y 0.026±0.006 g (M4). Esto

demuestra que existen diferencias entre los tratamientos con respecto a los valores registrados. Con relación al peso fresco (PFR) y seco de la raíz (PSR), los tratamientos con un medio basal compuesto por MS en distintas concentraciones fueron los que registraron los mayores valores de peso fresco y peso seco (Cuadro 4).

El mayor peso fresco (PFT) y seco total (PST) de las plantas se obtuvo con el tratamiento M4 (MS: concentración completa+30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa) 0.61±0.15 y 0.044±0.012 respectivamente, mientras que para la relación biomasa



**Figura 3:** Detalle de la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam. A. semillas germinadas sin testa; B, C. plántulas de 21 días en los biorreactores.

seca tallo y raíz (RBSA/BSR) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, aunque la mayor relación se registró con el M4 ( $2.36 \pm 2.34$ ).

Con respecto a la tasa de crecimiento absoluto (AGR) destacan los medios de cultivo compuestos por las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) con diferentes proporciones de sacarosa. Disminuyeron su incremento de crecimiento diario en la medida en que la concentración original de sales se diluía: completo ( $2 \pm 0.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 50% ( $1.7 \pm 0.4 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ) y 25% ( $1.2 \pm 0.4 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ); presentando diferencias significativas el último respecto a los anteriores.

En cuanto a la relación raíz:parte aérea (R:S), aunque no hubieron diferencias significativas entre tratamientos,

solo M5 (MS: 50%+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) y M6 (MS: 25%+30 g l<sup>-1</sup> sacarosa) superaron la unidad ( $1.05 \pm 0.31$  y  $1.17 \pm 0.18$  respectivamente), mientras que su inversa (S:R) tampoco demostró diferencias estadísticas.

En las relaciones de proporción de raíz (RMF) y parte aérea (LMF), todos los tratamientos analizados resultaron estadísticamente iguales y además demostraron por poco una igualdad de peso entre tallo y raíz (LMF) entre  $0.41 \pm 0.17$  y  $0.59 \pm 0.25$ .

La acumulación de masa seca también depende de la composición nutricional del medio de cultivo. Como se evidencia en la Fig. 4, se encontraron diferencias entre los diferentes medios de cultivo utilizados, pero la mayor

**Cuadro 4:** Análisis del crecimiento de plántulas de *Moringa oleifera* Lam. en condiciones *in vitro* en los diferentes medios de cultivo ensayados. PFA: peso fresco parte aérea en g; PFR: peso fresco radical en g; PFT: peso fresco total en g; PSA: peso seco parte aérea en g; PSR: peso seco radical en g; PST: peso seco total en g; RBSA/BSR: relación biomasa seca aérea y radical; LA: longitud aérea en cm; LR: longitud radical en cm; AGR: tasa de crecimiento absoluto ( $\text{mg día}^{-1}$ ); R:S: relación raíz: parte aérea a partir de los pesos de raíces, tallos, pecíolos y hojas; S:R: relación parte aérea: raíz; RMF: proporción de raíz, representa la relación entre la biomasa del sistema radical y la biomasa total de la planta ( $\text{g (raíz) g}^{-1}$  (planta) y LMF: proporción de parte aérea cuantifica la relación entre la biomasa de la parte aérea y la biomasa total de la planta;  $\text{g (parte aérea) g}^{-1}$  (planta). En una misma fila se comparan diferentes medios de cultivo. La comparación de las medias es en una misma fila. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ , Test de comparaciones múltiples de Tukey).

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
PFA (g)	0.25±0.04ab	0.15±0.05b	0.12±0.03b	0.38±0.07a	0.24±0.04ab	0.20±0.08b
PFR (g)	0.15±0.04ab	0.07±0.01ab	0.031±0.03b	0.23±0.09ab	0.27±0.13a	0.21±0.06ab
PFT (g)	0.40±0.08ab	0.23±0.06b	0.15±0.02b	0.61±0.15a	0.51±0.18ab	0.41±0.14ab
PSA (g)	0.011±0.002bc	0.006±0.004c	0.004±0.0006c	0.026±0.006a	0.018±0.003ab	0.012±0.004bc
PSR (g)	0.0102±0.003ab	0.0074±0.0002ab	0.0037±0.003b	0.0178±0.006a	0.019±0.007a	0.0144±0.003ab
PST (g)	0.021±0.004ab	0.013±0.004 b	0.008±0.002b	0.044±0.012 a	0.037±0.009a	0.027±0.007 ab
RBSA/BSR	1.14±0.19a	0.79±0.54 a	2.36±2.34a	1.54±0.32a	1.01±0.34a	0.85±0.15a
LA (cm)	7.09±1.7a	3.60±1.562a	1.14±0.455a	6.36±1.516a	4.20±1.127a	3.14±1.09a
LR (cm)	2.80±0.94a	2.29±0.69a	0.77±0.81a	2.06±0.13a	3±1.17a	2.04±0.35a
N° de hojas	2.90±0.08a	2.73±0.09a	0.67±0.36b	3.73±0.74a	2.82±1.10a	2.71±0.45 ab
AGR( $\text{mg día}^{-1}$ )	1±0.2ab	0.55±0.2 b	0.36±0.1b	2±0.5a	1.7±0.4 a	1.2±0.4 ab
R:S	0.88±0.17a	1.63±1.12a	0.94±0.94a	0.66±0.1a	1.05±0.31a	1.17±0.18a
S:R	1.14±0.20a	0.79±0.54a	2.36±2.3a	1.54±0.3a	1.01±0.34a	0.85±0.15a
RMF (g (raíz) $\text{g}^{-1}$ (planta))	0.46±0.04a	0.57±0.17a	0.4±0.25a	0.4±0.05a	0.50±0.07a	0.53±0.04a
LMF (g (parte aérea) $\text{g}^{-1}$ (planta))	0.52±0.04a	0.41±0.17a	0.59±0.25a	0.59±0.05a	0.48±0.07a	0.45±0.04a

acumulación de masa seca la expresó M4 (MS: concentración completa+30 g  $\text{l}^{-1}$  de sacarosa) con  $0.57 \pm 0.14$  g de masa seca por plántula, seguido por M5 y M6 ( $0.47 \pm 0.17$  y  $0.39 \pm 0.14$  g respectivamente).

## Discusión

Respecto a la presencia del tegumento seminal y su influencia en el proceso germinativo, Popinigis (1997) ha demostrado que el tegumento de las semillas de moringa posee sustancias inhibitoras de la germinación. Por ello se recomienda inmersión en agua destilada a temperatura ambiente por 24 horas para aumentar la permeabilidad de la testa y así promover o facilitar la germinación, ya que además se logran remover las sustancias inhibitoras. Estos resultados también los han validado Padilla et al. (2012). Por su parte, Pardos (2004) ha demostrado que, cuando las semillas están mucho tiempo en remojo o en contacto con

un ambiente húmedo, puede ocurrir pérdida de germinación y afectarse su viabilidad.

Existe como antecedente de germinación *in vitro* en moringa, la protrusión a los cinco días de siembra en medio semisólido de semillas sin testa, por lo que la utilización de medio líquido y biorreactores de inmersión temporal estarían mejorando el inicio del proceso de germinación. Por ello la integración de los sistemas automatizados con las pruebas de vigor consideradas tradicionales en la evaluación de la calidad de las semillas pueden contribuir al desarrollo de metodologías que permitan la estandarización de las pruebas de vigor (Marcos-Filho, 2010). Por otra parte, se han mejorado en todos los casos los resultados obtenidos por Matos Ruiz et al. (2016), quienes cultivaron semillas de *Moringa oleifera* sin testa en medio semisólido compuesto por el 100% de las sales MS, suplementado con 20 g  $\text{l}^{-1}$  de sacarosa, 1 mg  $\text{l}^{-1}$  de tiamina, 100 mg  $\text{l}^{-1}$  de mioinositol y sin

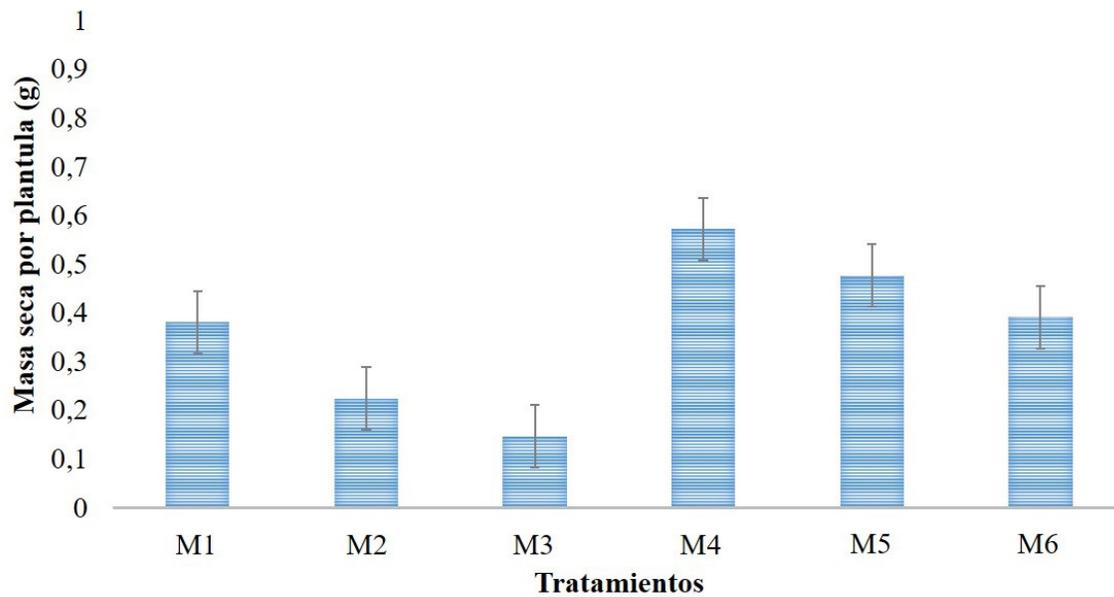


Figura 4: Masa seca por plántula obtenida con los diferentes medios de cultivo en la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam.

reguladores del crecimiento por 21 días, alcanzando una germinación de entre 31.35 y 54.24%.

El porcentaje de germinación y el efecto de la remoción del tegumento es coincidente con lo informado por Sharaf-Eldin et al. (2017). Las diferencias en los valores de germinación están relacionadas con el potencial de germinación, ya que se ha demostrado que *M. oleifera* disminuye su potencial de germinación o la viabilidad después de dos meses de almacenamiento (Pérez et al., 2010).

Las tasas de germinación en vivero y con diferentes tratamientos pre-germinativos que no incluyen remoción del tegumento reportadas para la especie varían entre 85 y 99% para semillas frescas (Toral et al., 2013). Esto no difiere de los resultados de este estudio, pero sí supera el índice de velocidad de germinación (IVG) reportado por los mismos autores. Por su parte, Muhl et al. (2011) comprobaron que el promedio de tiempo medio de germinación (TMG) para la especie está registrado en 17 días para condiciones de incubadoras con el mismo rango de temperaturas que las manejadas en el presente ensayo, obteniéndose un menor valor en éste ( $13.02 \pm 0.39$  días) y utilizando un medio basal compuesto por agua.

Los antecedentes acerca de indicadores de calidad fisiológica en la germinación *in vitro* de *M. oleifera* son, como la capacidad germinativa según la extensiva búsqueda

bibliográfica realizada a la fecha, inexistentes. La viabilidad de las semillas se mide por su capacidad para germinar y establecer plántulas normales. Desde un punto de vista fisiológico representa la capacidad de mantenerse metabólicamente activas para producir, cuando las condiciones son adecuadas, la energía necesaria para germinar y establecer plántulas normales. Por otra parte, aunque la máxima viabilidad (o máxima capacidad germinativa) de las semillas se alcanza en su madurez fisiológica, las condiciones que provee la planta madre impiden su germinación (Copeland y McDonald, 1995).

La uniformidad en la germinación puede ser expresada como la varianza de los tiempos individuales de las semillas respecto al promedio del tiempo de la muestra evaluada. A la par asumimos que el tiempo para completar la germinación se comporta como una distribución normal y mientras mayor resulte dicho valor, mayor será la uniformidad (Pulido-Flores y Monks, 2013).

Con relación al peso fresco (PFR) y seco de la raíz (PSR), los resultados obtenidos tienen coincidencia con los alcanzados por Shahzad et al. (2014), que recomiendan el uso de MS (Murashige y Skoog, 1962) como medio basal para la obtención de plántulas mediante la germinación de semillas de *M. oleifera*. Los estudios que relacionan las raíces con la parte aérea (biomasa de raíz/biomasa de parte

aérea) muestran que existe una interdependencia entre el sistema radical y la parte aérea de la planta y resaltan la importancia del equilibrio funcional entre las dos partes (Barrios et al., 2014).

En condiciones de turgencia plena, el peso fresco o húmedo es un buen estimador del volumen, ya que en general las variaciones en el peso específico de los tejidos vegetales son bajas. Esto es así debido a que el agua es el principal componente en casi todos los órganos y tejidos (las semillas son una notoria excepción). Sin embargo, el análisis clásico del crecimiento es un análisis de la acumulación de peso seco, que no estima bien el volumen, debido a que los tejidos pueden experimentar variaciones en su contenido porcentual de masa seca (ya que una proporción importante de los fotoasimilados almacenados en una célula pueden ser transitorios). En contrapartida, el peso seco es un muy buen estimador del carbono total de la planta, lo que permite analizar importantes aspectos de su fisiología (Di Benedetto y Tognetti, 2016).

La determinación de la tasa de crecimiento absoluta, de acuerdo con la etapa fisiológica del cultivo, permite valorar la absorción de nutrientes y acumulación de masa seca por la planta directamente relacionada con la fotosíntesis (Jiménez-Terry et al., 2013). Núñez et al. (2009) describieron que la tasa de crecimiento absoluta es un índice fisiológico relacionado con el crecimiento de las plantas que no expresa la intensidad con que se produce el cambio, pero estima el ritmo de producción de masa seca por planta por unidad de tiempo. Particularmente se han encontrado antecedentes de mediciones de dicho parámetro en condiciones *in vitro*, en su mayoría relacionando calidades lumínicas con su expresión. Sin embargo, con reportes inexistentes en la especie y sin estudios vinculados con la influencia de la composición del medio basal sobre este índice de eficiencia fisiológica en particular, los resultados obtenidos permiten concluir que la tasa de crecimiento absoluto en *M. oleifera* en condiciones *in vitro* está estrechamente relacionada con la composición del medio de cultivo.

En general, las proporciones de peso entre los diferentes órganos cambian durante la ontogenia. Lo que se está cuantificando cuando se pesa un órgano en un determinado momento es el resultado de la distribución del carbono en etapas previas y no necesariamente indica cómo

está siendo particionado el carbono al momento de la medición. Por este motivo, la relación raíz:parte aérea (R:S) puede mostrar valores muy superiores a la unidad en etapas tempranas, aun cuando el carbono se esté particionando preferentemente hacia la parte aérea. En consecuencia, las proporciones dan idea de la situación en un instante dado, pero no su proyección en el tiempo (Di Benedetto y Tognetti, 2016). La relación raíz:parte aérea, así como su inversa, la relación parte aérea:raíz, son útiles para caracterizar el equilibrio funcional de la planta en sus intercambios con el ambiente aéreo y subterráneo (Kang y Van Iersel, 2004). Finalmente, cabe destacar que es útil tener en cuenta que la relación raíz:parte aérea también puede expresarse en términos de áreas expuestas al ambiente, lo que generalmente les otorga una mayor significancia ecofisiológica (Di Benedetto y Tognetti, 2016).

Cuando se quiere estimar la partición de carbono asignado a cada órgano, se presenta el problema de que pequeños cambios en la asignación del carbono lleva a grandes cambios en estas relaciones. Justamente para evitar este problema se desarrollaron las relaciones RMF y LMF, en las que el denominador es el peso total de la planta (Poorter y Sack, 2012). Sin embargo, estas relaciones tienen a su vez la dificultad de que pequeños cambios en ellas pueden representar grandes modificaciones en el equilibrio funcional de la planta.

Los resultados obtenidos evidencian que la acumulación de masa seca también depende de la composición nutricional del medio de cultivo (Martínez-Villegas et al., 2015). La asimilación de masa seca y su distribución dentro de la planta son procesos importantes que determinan la productividad del cultivo; es comúnmente usada como parámetro para caracterizar el crecimiento (Tekalign y Hammes, 2005).

## Conclusiones

La remoción de la testa de la semilla y la composición química del medio de cultivo influyen positivamente mejorando el proceso de germinación *in vitro* de *M. oleifera*. Por ello se recomienda el uso de MS como medio basal para la obtención de plántulas mediante la germinación de semillas de *M. oleifera* que, junto con la remoción de la testa, aceleran el proceso y posibilitan obtener plántulas que po-

drán ser utilizadas para experimentos de regeneración indirecta y/o directa para un escalado masivo de germoplasma.

## Contribución de autores

CVL concibió, diseñó el estudio, adquirió los datos, los analizó e interpretó y escribió el documento.

## Financiamiento

Este estudio fue financiado por PI N°16A001-Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste.

## Literatura citada

- Agramonte, D., M. Pons-Corona, M. Pérez, M. la O, L. García-Águila, M. Freire-Seijo y F. Jiménez-Terry. 2014. Obtención de plantas *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam. var. 'PKM criolla' a partir de segmentos nodales. *Biología Vegetal* 14(4): 223-227.
- Aragón, C., L. Carvalho, J. González, M. Escalona y S. Amancio. 2011. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Reports* 31(4): 757-769. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1195-7>
- Barrios, M., A. Buján, S. Debelis, A. Sokolowski, A. Blasón, H. Rodríguez, S. López, J. De Grazia, C. Mazo y M. Gagey. 2014. Relación biomasa de raíz/biomasa total de soja (*Glycine max*) en dos sistemas de labranza. *Terra Latinoamericana* 32(3): 221-230.
- Bolarinwa, I., T. Aruna y A. Raji. 2017. Nutritive value and acceptability of bread fortified with moringa seed powder. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.05.002>
- Canett Romero, R., V. Domínguez Corrales y G. Torres Montañón. 2016. Aspectos importantes de *Moringa oleifera*: una alternativa para tratar la anemia por deficiencia de hierro. *Biotecnia* 18(1): 3-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.18633/bt.v18i1.240>
- Copeland, L. O. y M. B. McDonald. 1995. *Principles of Seed Science and Technology*. Third edition. Chapman and Hall. New York, USA. 409 pp.
- Di Benedetto, A. y J. Tognetti. 2016. Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *RIA (Revista de Investigaciones Agropecuarias)* 42(3): 258-282.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. W. Robledo. 2011. *Software InfoStat*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (consulta de septiembre de 2018).
- FAO. 2011. *Semillas en emergencias (Manual técnico)*. Estudio FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) producción y protección vegetal 202. Roma, Italia. 83 pp.
- Fernández Sobrados, J., G. Pascual Chagman, M. Silva Jaimes, B. Salvá Ruiz, A. Guevara Pérez y C. Encina Zelada. 2018. Efecto del tratamiento enzimático de la semilla de moringa (*Moringa oleifera*) sobre las características físico-químicas del aceite obtenido por extracción con prensa expeller. *Scientia Agropecuaria* 9(3): 371-380. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.03.08>
- Fogaça, C. A., M. De Matos Malavasi, C. Zucareli y U. Contro Malavasi. 2006. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. *Caesalpinaceae*. *Revista Brasileira de Sementes* 28(3): 101-107. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222006000300015>.
- Bekendam, J. 1980. *Manual para evaluación de plántulas en análisis de germinación*. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Estación de Ensayo de Semillas. Madrid, España. 129 pp.
- Jiménez-Terry, F., F. Agramonte, M. Pérez, M. Pons, M. Rodríguez, M. la O, O. Hurtado, A. Pérez y M. Leiva-Mora. 2013. Efecto del sustrato sobre la producción de minitubérculos de papa en casa de cultivo a partir de plantas *in vitro*. *Biología Vegetal* 13(3): 169-180.
- Kang, J. G. y M. W. Van Iersel. 2004. Nutrient solution concentration affects shoot:root ratio, leaf area ratio, and growth of subirrigated salvia (*Salvia splendens*). *Hort-Science* 39(1): 49-54. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.1.49>
- Luna, C., R. Acevedo, M. Collavino, A. González, L. Mroginski y P. Sansberro. 2013. Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: their localisation, characterisation, and response to isothiazolone biocides. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 49: 326-332. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9500-5>
- Marcos-Filho, J. 2010. Sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas (SVIS®) para avaliação do vigor de sementes. *Informativo ABRATES* 20(3): 40-44.

- Martín, C., G. Martín, A. García, T. Fernández, E. Hernández y J. Puls. 2013. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*: Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes* 36(2): 137-149.
- Martínez-Villegas, Y., M. Andrade-Rodríguez, T. Colinas-León, O. Villegas-Torres, A. Castillo-Gutiérrez e I. Alía-Tejacal, 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* L.) en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 38(4): 369-374.
- Matos Ruiz, A., I. Capote Betancourt, A. Pérez Martínez, Y. Lezcano Más, C. Aragón Abreu, D. Pina Morgado, K. Vives Hernández, M. Daquinta Gradaille y M. Escalona Morgado. 2016. Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cultivos Tropicales* 37: 49-56. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1717.7202>
- Medina, M., D. E. García, T. Clavero y J. M. Iglesias. 2007. Estudio comparativo de *Moringa oleifera* y *Leucaena leucocephala* durante la germinación y la etapa inicial de crecimiento. *Zootecnia Tropical* 25(2): 83-93.
- Monroy Álvarez, I. E. y J. J. Filgueira Duarte. 2010. Organogenesis directa en medio líquido en clavel en un bioreactor de bajo costo. Universidad Militar Nueva Granada, *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 6(1): 84-93.
- Muhl, Q. E., E. S. du Toit y P. J. Robbertse. 2011. Temperature effect on seed germination and seedling growth of *Moringa oleifera* Lam. *Seed Science and Technology* 39: 208-213. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.19>
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Navarro, M., S. M. Cicero y F. G. Gomes-Junior. 2015. Determination of the germination temperature of *Moringa oleifera* seeds with support of vigor tests. *Cuban Journal of Agricultural Science* 49(4): 509-514.
- Ñúñez, C. E., M. Santos y M. Segura. 2009. Acumulación y distribución de materia seca de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Zipaquirá, Cundinamarca, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 62(1): 26-38.
- Olson, M. E. y J. W. Fahey. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(4): 1071-1082. DOI: <https://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.678>
- Padilla, C., N. Fraga y M. Suárez. 2012. Efecto del tiempo de remojo de las semillas de moringa (*Moringa oleifera*) en el comportamiento de la germinación y en indicadores del crecimiento de la planta. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 46(4): 419-421.
- Pardos, J. A. 2004. Repuesta de las plantas al anegamiento del suelo. *Forest Systems* 13: 101-107. DOI: <https://doi.org/10.5424/srf/20041351-00858>.
- Pérez, A., T. Sánchez, N. Armengol y F. Reyes. 2010. Características y potencialidades de *Moringa oleifera* Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes* 33(4): 1-1-16.
- Poorter, H. y L. Sack. 2012. Pitfalls and possibilities in the analysis of biomass allocation patterns in plants. *Frontiers in Plant Science* 3: 259. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00259>.
- Popinigis, F. 1997. Fisiología de semente. AGIPLAN (Ministerio de Agricultura). Brasilia, Brasil. 298 pp.
- Pulido-Flores, G. y S. Monks. 2013. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II. In: Pulido-Flores, G. y S. Monks (eds.). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-Zea Books. Lincoln, USA. 146 pp.
- Saini, R. K., I. Sivanesan y Y-S. Keum. 2016. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech* 6(2): 203. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0526-3>
- Salem, J. 2016. *In vitro* propagation of *Moringa oleifera* L. under salinity and ventilation conditions. *Genetics and Plant Physiology* 6(1-2): 54-64.
- Shahzad, U., M. Jaskani, S. Ahmad y F. Awan. 2014. Optimization of the micro-cloning system of threatened *Moringa oleifera* Lam. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 51(2): 449-457.
- Shahzad, U., M. A. Khan, M. J. Jaskani, I. A. Khan y S. S. Korban. 2013. Genetic diversity and population structure of *Moringa oleifera*. *Conservation Genetics* 14: 1161-1172. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0503-x>.
- Sharaf-Eldin, M. A., P. Alam y S. A. Mahfouz. 2017. Efficacy of hard seed shell and wings on seed germination of *Moringa oleifera*. *Acta Horticulturae* 1158: 125-132. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1158.15>
- Steinitz, B., Y. Tabib, V. Gaba, T. Gefen y Y. Vaknin. 2009. Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 45: 65-71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9162-x>

- Tekalign, T. y P. S. Hammes. 2005. Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth I. Stomatal conductance, rate of transpiration, net photosynthesis, and dry matter production and allocation. *Scientia Horticulturae* 105(1): 13-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.029>
- Toral, O., J. Reino, H. Santana y Y. Cerezo. 2013. Caracterización morfológica de ocho procedencias de *Moringa oleifera* (Lam.) en condiciones de vivero. *Pastos y Forrajes* 36(4): 409-416.
- Villarreal Gómez, A. y K. Ortega Angulo. 2014. Revisión de las características y usos de la planta *Moringa oleifera*. *Investigación y Desarrollo* 22(2): 309-330. DOI: <http://dx.doi.org/10.14482/indes.22.2.6272>
- Watt, M. P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 11(76): 14025-14035. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB12.1693>