







Evaluación de la germinación, desarrollo y multiplicación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam en diferentes medios de cultivos

In vitro evaluation of germination, development and multiplication of *Moringa oleifera* Lam in different culture media

Avaliação *in vitro* da germinação, desenvolvimento e multiplicação de *Moringa oleifera* Lam em diferentes meios de cultura

José Leonardo Ledea-Rodríguez¹; Juan José Reyes-Pérez²;
Thelma Castellanos-Cervantes¹; Carlos Angulo¹; Teodoro
Reynoso-Granados¹; Lilia Alcaraz-Meléndez^{1*}

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Instituto Politécnico Nacional. N° 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur, México. Correos electrónicos: (JL) jledea@pg.cibnor.mx, ; (TC) tcastell@cibnor.mx, ; (CA) eangulo@cibnor.mx, ; (TR) treynoso04@cibnor.mx, ; (LA) lalcaraz04@cibnor.mx,  ²Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito. Km 1 ½ vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Correos electrónicos: jreyes@uteq.edu.ec, .

Resumen

Se desarrolló un estudio con el fin de evaluar la germinación, desarrollo y multiplicación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam sobre diferentes medios de cultivos, utilizando semillas colectadas en un ecosistema árido. Se evaluaron los medios de cultivos Murashige y Skoog (MS), Murashige y Skoog y sales de Gamborg (MSG), Agua-Agar (0,8 %) y medio húmedo en un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones. Se evaluaron variables relacionadas con la germinación, desarrollo de plántulas y su posterior proceso de multiplicación en condiciones *in vitro*. El medio de cultivo húmedo superó significativamente ($P \leq 0,05$) al resto de los medios en la germinación acumulada (100 %) e indicadores fisiológicos asociados a la germinación.

Recibido el 02-03-2020 • Aceptado el 05-05-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: lalcaraz04@cibnor.mx

El peso de la semilla fue el que más contribuyó al proceso de germinación. Existió un bajo ($P \geq 0,05$) porcentaje de contaminación para todos los tratamientos. Asimismo, en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, los medios MS, Agua-Agar y Húmedo, estimularon ($P \leq 0,01$) la producción de hojas ($7,08 \pm 1,2$; $6,62 \pm 0,7$; $5,50 \pm 0,9$, en orden) en comparación con el MSG ($4,8 \pm 2,2$), sin embargo, este último estimuló mayor ($P \leq 0,01$) número de brotes ($0,20 \pm 0,5$) que los medios, húmedo y Agua-Agar y desarrolló plántulas con raíces más largas ($76,92 \pm 17,6$ mm) que el MS ($P \leq 0,05$). Para la multiplicación solo los medios MS y MSG con adición de $4,44 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 6-BA permitieron la producción de explantes, el MSG aportó el mayor ($P \leq 0,01$) valor con 31,54 % de explantes. Los medios MS y MSG no son necesarios en la germinación de las semillas en condiciones *in vitro*, pero indispensables en el proceso de crecimiento, desarrollo multiplicación de brotes apicales.

Palabras claves: moringácea; vitroplantas, *in vitro*, cultivo.

Abstract

A study was carried out in order to evaluate the germination, development and multiplication of *Moringa oleifera* Lam *in vitro* on different culture media, using seeds collected in an arid ecosystem. Murashige and Skoog (MS), Murashige and Skoog culture media and Gamborg (MSG), Water-Agar (0.8 %) and wet medium were evaluated in a completely randomized design with five replications. Variables related to germination, seedling development and its subsequent multiplication process were evaluated under *in vitro* conditions. The wet culture medium significantly outperformed ($P \leq 0.05$) the rest of the media in accumulated germination (100 %) and physiological indicators associated with germination. The weight of the seed was the one that most contributed to the germination process. There was a low ($P \geq 0.05$) percentage of contamination for all treatments. Likewise, in the growth and development of seedlings, the MS, Water-Agar and Wet media, stimulated ($P \leq 0.01$) the production of leaves (7.08 ± 1.2 ; 6.62 ± 0.7 ; 5.50 ± 0.9 , in order) compared to the MSG (4.8 ± 2.2), however, the latter stimulated more ($P \leq 0.01$) number of shoots (0.20 ± 0.5) than the media, wet and Water-Agar and developed seedlings with longer roots (76.92 ± 17.6 mm) than the MS ($P \leq 0.05$). For the multiplication, only the MS and MSG media with the addition of $4.44 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ of 6-BA allowed the production of explants, the MSG provided the highest ($P \leq 0.01$) value with 31.54 % of explants. MS and MSG media are not necessary in seed germination under *in vitro* conditions, but essential in the growth process, development, multiplication of apical shoots.

Keywords: moringacea; vitro plants, *in vitro*, cultures.

Resumo

Foi desenvolvido um estudo para avaliar a germinação, desenvolvimento e multiplicação de *Moringa oleifera* Lam *in vitro* em diferentes meios de cultura, utilizando sementes coletadas em um ecossistema árido. Os meios de cultura

Murashige e Skoog (MS), Murashige e Skoog e sais de Gamborg (MSG), ágar-água (0,8 %) e meio úmido foram avaliados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Variáveis relacionadas à germinação, desenvolvimento de plântulas e seu subsequente processo de multiplicação foram avaliadas em condições *in vitro*. O meio de cultura úmido superou significativamente ($P \leq 0,05$) o restante dos meios em germinação acumulada (100 %) e indicadores fisiológicos associados à germinação. O peso da semente foi o que mais contribuiu para o processo de germinação. Houve uma baixa ($P \geq 0,05$) porcentagem de contaminação para todos os tratamentos. Da mesma forma, no crescimento e desenvolvimento das mudas, a MS, o ágar-água e o meio úmido estimularam ($P < 0,01$) a produção de folhas ($7,08 \pm 1,2$; $6,62 \pm 0,7$; $5,50 \pm 0,9$, em ordem) em comparação com o MSG ($4,8 \pm 2,2$); no entanto, este último estimulou um número maior ($P < 0,01$) de surtos ($0,20 \pm 0,5$) que o meio, úmido e ágar-água e desenvolveram mudas com raízes mais longas ($76,92 \pm 17,6$ mm) que as MS ($P \leq 0,05$). Para a multiplicação, apenas os meios MS e MSG com a adição de $4,44 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de 6-BA permitiram a produção de explantes, o MSG forneceu o valor mais alto ($P < 0,01$) com 31,54 % dos explantes. Os meios MS e MSG não são necessários na germinação de sementes sob condições *in vitro*, mas são essenciais no processo de crescimento, desenvolvimento, multiplicação de brotações apicais.

Palavras-chave: moringaícea; vitroplantas, *in vitro*, cultivo.

Introducción

El cultivo de células y tejidos, es una técnica prometedora para la multiplicación *in vitro* y conservación de la planta a partir del principio de totipotencia (Ochoa-Villarreal *et al.* 2015). Hay varias áreas de cultivo *in vitro* que tienen una aplicación práctica potencial, sin embargo, actualmente el enfoque más común es para la clonación o propagación en masa de genotipos seleccionados (Conger, 2018).

La Moringa es un árbol caducifolio originario de la India de rápido crecimiento en los primeros estadios, debido al contenido de ácidos grasos en la semilla que son utilizados como fuente de energía después de la emisión de la primera radícula (Luna, 2019). Esta y otras características le

Introduction

Cells and tissues cultures, are promising techniques for *in vitro* multiplication and conservation of the plant from the principle of totipotency (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2015). There are several areas of *in vitro* culture that have a potential practical application, however, currently the most common approach is for cloning or mass propagation of selected genotypes (Conger, 2018).

Moringa is a deciduous tree native to India, fast-growing in the early stages, due to the content of fatty acids in the seed that are used as an energy source after the emission of the first radicle (Luna, 2019). This and other characteristics have allowed its distribution on several continents proving to be a species with ecological

han permitido su distribución en varios continentes demostrando ser una especie con plasticidad ecológica (Avila-Treviño *et al.*, 2017).

Dentro del género existen 13 especies, donde la *Moringa oleifera* Lam ha sido la más estudiada (Nouman *et al.*, 2013). Sin embargo, la conservación del germoplasma es pobre, lo que denota en una preocupación a nivel internacional desde las perspectivas de dietética y farmacológica (Shahzad *et al.*, 2014), al constituir esta planta una fuente de alimentación en países en vías de desarrollo por los altos contenidos de metabolitos primarios (30 % de proteínas en hojas) (García-López, 2016) y como suplemento alimentario en grupos etarios de riesgo por la amplia representación de compuestos antioxidantes que están contenidos en las hojas (Okiki *et al.*, 2015).

A través del cultivo de tejidos en *Moringa* se han desarrollado ensayos para la germinación, multiplicación y generación de nuevas plantas a partir de segmentos nodales (Saini *et al.*, 2012), donde la germinación, crecimiento y desarrollo de las vitroplantas como un proceso escalonado y/o continuo muestran resultados aislados, considerándose que ha tenido una pobre atención en las evaluaciones *in vitro* la efectividad de los medios de cultivos en las etapas que preceden a la propagación (Poothong *et al.*, 2018).

Los medios para el cultivo vegetal *in vitro* se componen mayoritariamente de minerales, compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento y fuentes de carbono (Lambardi *et al.*, 2013).

plasticity (Avila-Treviño *et al.*, 2017).

Within the genus there are 13 species, where the *Moringa oleifera* Lam. has been the most studied (Nouman *et al.*, 2013). However, the poor conservation of germplasm, denotes an international concern from the perspectives of dietetics and pharmacological (Shahzad *et al.*, 2014), as this plant is a food source in developing countries because of high content of primary metabolites (30 % protein in leaves) (García-Lopez, 2016) and as a food supplement in risky age groups by the wide representation of antioxidant compounds contained in the leaves (Okiki *et al.*, 2015).

Through the cultivation of tissues in *Moringa*, trials have been developed for germination, multiplication and generation of new plants from nodal segments (Saini *et al.*, 2012), where the germination, growth and development of vitroplants as a phased and/or continuous process show isolated results, considering that poor attention has been taken in *in vitro* assessments of the media of crops in the stages preceding propagation (Poothong *et al.*, 2018).

The means for *in vitro* plant cultivation are mostly composed of minerals, organic compounds, growth regulators and carbon sources (Lambardi *et al.*, 2013). Within this group of nutrients, minerals trigger an essential role in the growth and development of plants (Murashige and Skoog, 1962), and have been used interchangeably for the cultivation of *Moringa oleifera* Lam. (Matos-Ruiz *et al.*, 2016), without considering in any case the needs of the plant.

Dentro de este grupo de nutrientes, los minerales desencadenan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Murashige y Skoog, 1962), e indistintamente se han utilizado para el cultivo de la *Moringa oleifera* Lam (Matos-Ruiz *et al.*, 2016), sin considerar en ninguno de los casos las necesidades de la planta.

En general, la formulación de Murashige y Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962) se utiliza para el cultivo *in vitro* de muchas plantas. Sin embargo, investigaciones relacionadas con su eficacia han demostrado que algunas plantas no crecen bien en este medio (Poothong *et al.*, 2018).

Proponiendo como objetivo del presente estudio evaluar la germinación, desarrollo y multiplicación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam sobre diferentes medios de cultivos, utilizando semillas colectadas en un ecosistema árido.

Materiales y métodos

Material biológico y desinfección

Las semillas de *M. oleifera* se colectaron en las coordenadas N 240° 07'45,47" y W 110° 20'14,72" en el estado de Baja California Sur, México. El proceso de separación de frutos y semillas se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), para la clasificación de las semillas se emplearon criterios cualitativos, valorándose la presencia o no de ruptura o hendiduras a nivel de la testa, aspecto fresco, ausencia de insectos, gusanos y coleópteros.

In general, the formulation of Murashige and Skoog (MS; Murashige and Skoog, 1962) is used for *in vitro* cultivation of many plants. However, research related to its effectiveness has shown that some plants do not grow well in this environment (Poothong *et al.*, 2018).

The objective of this study was to evaluate germination, development and *in vitro* multiplication of *Moringa oleifera* Lam. on different culture media, using seeds collected in an arid ecosystem.

Materials and methods

Biological material and disinfection

The seeds of *M. oleifera* were collected at coordinates N 240° 07'45.47" and W 110°20'14.72" at state of Baja California Sur, Mexico. The process of separation of fruits and seeds was developed in the Biotechnology Laboratory of the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), for the classification of seeds, qualitative criteria were used, assessing the presence or not of rupture or slits at the testa, fresh appearance, absence of insects, worms and coleoptera.

One thousand tree hundred forty-five seeds were collected, and 10% was randomly separated; they were determined with a digital vernier with precision of 0,01 mm (Fisher Scientific, model 9 in.), the width (mm) was considered as the perpendicular diameter; length (mm) as the parallel diameter with respect to the micropile shaft, thickness (mm) as the mean level of the micropile axis. The weight (g) was quantified in an analytical

Se acopiaron 1345 semillas, y de forma aleatoria se separó el 10 %; se les determinó con un vernier digital con precisión de 0,01 mm (Fisher Scientific, modelo 9 in.), el ancho (mm), considerado como el diámetro perpendicular; largo (mm), como el diámetro paralelo con respecto al eje del micrópilo, espesor (mm), al nivel medio del eje del micrópilo. El peso (g) se cuantificó en una balanza analítica (Ohaus, OHAUS, EUA), con una precisión de 0,0001 g, del fruto se valoraron sus dimensiones (largo y ancho) con ayuda de una regla y un vernier respectivamente.

Se les retiró la testa a las semillas y se lavaron con agua y detergente comercial durante dos minutos, luego se enjuagaron con agua destilada y seguidamente se introdujeron en etanol (70 % v/v) durante un minuto dentro de una campana de flujo laminar, para luego introducirlas en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 15 % (v/v) durante veinte minutos en agitación constante (110 rpm). Una vez extraídas de la solución desinfectante fueron enjuagadas con agua destilada estéril por cinco ocasiones durante media hora en agitación constante.

Medios de cultivos y germinación de semillas

Para la germinación de las semillas se emplearon cuatro medios de cultivos: Murashige y Shoog con adición de sales de medio B5 basal Gamborg (Medio MS + vitaminas del Medio B5; 3 % sacarosa; 10 % agar y pH 5,8) (Gamborg, 1970); Murashige y Shoog (MS con 3 % sacarosa; 10 % agar y pH 5,8) (Murashige y Skoog, 1962);

balance (Ohaus, OHAUS, USA), with an accuracy of 0,0001 g, of the fruit its dimensions (length and width) were assessed with the help of a ruler and a vernier respectively.

The seeds were removed and washed with water and commercial detergent for two minutes, they were then rinsed with distilled water and then introduced into ethanol (70 % v/v) for one minute inside a laminar flow hood, then placed in a 15% sodium hypochlorite solution (v/v) for twenty minutes in constant agitation (110 rpm). Once extracted from the disinfectant solution they were rinsed with sterile distilled water five times for half an hour in constant agitation.

Crop media and seed germination

Four culture media were used for seed germination: Murashige and Skoog with the addition of Gamborg basal B5 medium salts (Medium MS+ medium vitamins B5; 3 % sucrose; 10 % agar and pH 5.8) (Gamborg, 1970); Murashige and Shoog (MS with 3 % sucrose; 10 % agar and pH 5,8) (Murashige and Skoog, 1962); medium with Water-Agar 0,8 % (8 g.L⁻¹ water (w/v)) and wet medium (cotton soaked in sterile distilled water).

The pH for all media was adjusted to 5.8 with a sodium hydroxide solution 1 N by pH meter 3320. Each medium was inserted into an autoclave for 15 min to 240 lb of pressure in 120 mL lided bottles. Previously disinfected seeds were placed inside jars with sterile culture media in a laminar flow hood. The bottles were sealed and then moved to a growing room with a temperature of 25 °C, 70 % relative humidity and 24 light hours.

medio con Agua-Agar 0,8 % (8 g.L⁻¹ de agua (p/v)) y medio húmedo (algodón embebido en agua destilada estéril).

Se ajustó el pH para todos los medios a 5,8 con una solución de hidróxido de sodio 1 N mediante un pHmetro 3320. Cada medio se introdujo en autoclave por 15 min a 240 lb de presión en frascos con tapa de 120 mL. Las semillas previamente desinfectadas fueron colocadas dentro de frascos con medios de cultivos estéril en una campana de flujo laminar. Los frascos se sellaron y luego se trasladaron a un cuarto de cultivo con temperatura de 25 ± 4 °C, humedad relativa de 70 % y 24 horas luz.

Germinación

Se evaluó el porcentaje de germinación y de contaminación de forma diaria, se consideró como semilla germinada aquella que mostró una raíz de 5 mm de longitud (Luna, 2019). Se cuantificó: días para comenzar la germinación (DPG), tiempo medio de germinación (TMG, %) (Ellis y Roberts, 1980), índice de velocidad de germinación (IVG) e índice de germinación (IG) (Ranal y De Santana, 2006) mediante las siguientes ecuaciones:

$$TMG = \frac{\# \text{ semillas germinadas} \times \# \text{ de días de siembra}}{\text{Semillas germinadas}}$$

$$IVG = \frac{C_i}{C_i T_i}$$

Dónde: C_i= Número de semillas germinadas por día; T_i= Tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo de germinación.

$$IG = \frac{\# \text{ semillas germinadas}}{\text{días para la germinación de la primera semilla}} + \frac{\# \text{ de semillas germinadas}}{\text{días hasta la germinación de la última semilla}}$$

Germination

The percentage of germination and contamination was evaluated on a daily basis, the seed that showed a root of 5 mm in length (Moon, 2019) was considered as germinated seed. Quantified: days to start germination (DPG), mean germination time (TMG, %) (Ellis and Roberts, 1980), germination rate index (IVG) and germination index (IG) (Ranal and De Santana, 2006) using the following equations:

$$TMG = \frac{\# \text{ semillas germinadas} \times \# \text{ de días de siembra}}{\text{Semillas germinadas}}$$

$$IVG = \frac{C_i}{C_i T_i}$$

Where: C_i= Number of seeds germinated per day; T_i= Time elapsed since the start of the germination test.

$$IG = \frac{\# \text{ semillas germinadas}}{\text{días para la germinación de la primera semilla}} + \frac{\# \text{ de semillas germinadas}}{\text{días hasta la germinación de la última semilla}}$$

Growth and development of emerging seedlings

After germination and during seedling growth, to determine growth rates measurements were made every other day with a digital vernier until the plants were about to exceed the capacity of the bottle, at this time they were extracted for multiplication and morphological measurements of stems were developed (length and width, mm, from the base to the appearance of the first leaf and 10 mm from its base, respectively), leaves (number, morphology, for this the measurements were developed on the first leaf and its length, considered from the base to the apex,

Crecimiento y desarrollo de plántulas emergidas

Luego de la germinación y durante el crecimiento de las plántulas, para determinar las tasas de crecimiento se realizaron mediciones cada dos días con un vernier digital hasta que las plantas estuvieron por exceder la capacidad del frasco, en este momento se extrajeron para la multiplicación y se desarrollaron las mediciones morfológicas de tallos (largo y ancho, mm, desde la base hasta la aparición de la primera hoja y a 10 mm de su base, respectivamente), hojas (número, morfología, para ello las mediciones se desarrollaron en la primera hoja y se midió su longitud, considerada desde la base hasta el ápice, y el ancho en la porción media). Con las medidas de las hojas se estimó el área foliar (Ahmed *et al.*, 2011): $AF=L \times A \times 0,55$; Dónde: L=longitud máxima; A=ancho (promedio de la porción base, media y apical), 0,55= constante.

A partir del valor del área foliar se calculó la Duración del área foliar (DAF) e Índice de Área foliar (IAF) según el método clásico de análisis del crecimiento de acuerdo con Hunt and Hunt (1990) a partir de la relación altura y tiempo de crecimiento.

$$DAF= A_2 + A_1 - \frac{T_2 - T_1}{2}$$

$$IAF= \frac{A_2 + A_1}{2 \times \left(\frac{1}{S}\right)}$$

Dónde: A_1 =Altura inicial; A_2 =Altura final; T_1 =Tiempo inicial; T_2 =Tiempo final; S=área del suelo cubierta.

Para estimar la tasa de crecimiento absoluta (TCA) y tasa de crecimiento

and the width in the middle). With the measurements of the leaves the foliar area was estimated (Ahmed *et al.*, 2011): $AF=L \times A \times 0,55$; Where: L= Maximum length; A= wide (average base, mean, and apical portion), 0,55= constant.

From foliar area value, the Foliar Area Duration (DAF) and Foliar Area Index (IAF) was calculated according to the classic method of growth analysis according to Hunt and Hunt (1990) from the height and growth time ratio.

$$DAF= A_2 + A_1 - \frac{T_2 - T_1}{2}$$

$$IAF= \frac{A_2 + A_1}{2 \times \left(\frac{1}{S}\right)}$$

Where: A_1 =Initial Height; A_2 =Final Height; T_1 =Initial time; T_2 =End time; S=coved floor area

To estimate the absolute growth rate (TCA) and relative growth rate (TCR), it was proceeded using the criteria described by (Gardner *et al.*, 2003).

$$TCR \text{ (cm cm}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \left(\frac{A_2 - A_1}{T_2 - T_1}\right) \times \left(\frac{1}{A_2}\right)$$

$$TCA \text{ cm día}^{-1} = \frac{A_2 - A_1}{T_2 - T_1}$$

Where: A_1 =Initial Height; A_2 =Final Height; T_1 =Initial time; T_2 =End time
Multiplication

The culture media was added to 4,44 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ of 6-BA (6-Benciladenine) (Saini *et al.* 2012). These underwent the same sterilization, packaging and cooling process as described for germination, growth and development

relativa (TCR), se procedió mediante los criterios descritos por (Gardner *et al.*, 2003).

$$TCR (\text{cm cm}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \left(\frac{A_2 - A_1}{T_2 - T_1} \right) \times \left(\frac{1}{A_2} \right)$$

$$TCA \text{ cm día}^{-1} = \frac{A_2 - A_1}{T_2 - T_1}$$

Dónde: A_1 = Altura inicial; A_2 = Altura final; T_1 = Tiempo inicial; T_2 = Tiempo final

Multiplicación

Se le adicionaron a los medios de cultivos 4,44 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de 6-BA (6-Benciladenina) (Saini *et al.* 2012). Estos se sometieron al mismo proceso de esterilización, envasado y enfriamiento que el descrito para la germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas germinadas. Para la estimación del porcentaje de explantes del proceso de multiplicación se atendieron las consideraciones de Rubluo *et al.* (1984).

Diseño experimental y análisis estadístico

El estudio se desarrolló en un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco repeticiones, se consideraron como tratamientos diferentes medios de cultivo; Tratamiento T1: Medio de Cultivo Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg (B5) (MSG); T2: Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS); T3: Agua-Agar 0,8 %; T4: Medio de cultivo húmedo (control). Las repeticiones estuvieron constituidas por 16 plantas por tratamientos, de las cuales, y en forma aleatoria, se seleccionaron cinco, que constituyeron

of germinated seedlings. Rubluo *et al.* (1984) considerations were addressed for the estimation of the percentage of explants in the multiplication process.

Experimental design and statistical analysis

The study was developed in a fully randomized experimental design with five repetitions, different culture media treatments were considered; Treatment T1: Murashige and Skoog Culture Medium with Gamborg Vitamins (B5) (MSG); T2: Murashige and Skoog (MS) culture medium; T3: Water-Agar 0.8 %; T4: Wet culture medium (control). The repetitions consisted of 16 plants by treatments, of which, five were randomly selected, which constituted observations within each repetition in each treatment, for a total of 25 observations per treatment.

Statistica v.12.0 (Statsoft) was used for statistical analysis, and data normality was checked using the Kolmogorov-Smirnov test (Massey, 1951) and the uniformity of variances according to Bartlett's criterion (Bartlett, 1937).

To determine the growth curve, a nonlinear regression analysis was performed from the age and height of the plant. Models used were; Logistic (Nelder, 1961): $Y = a / (1 + b * \exp(-c * T))$, where: Y = is the growth of the organism at the time t ; a = is the maximum asymptotic growth this is when t tends to infinity; b = is the curvature parameter that expresses how fast it reaches maximum growth or delay time; c = growth rate; T = time in days.

las observaciones dentro de cada repetición en cada tratamiento, para un total de 25 observaciones por tratamiento.

Para el análisis estadístico se empleó el programa Statistica v.12.0 (Statsoft), y se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951) y la homogeneidad de varianzas según el criterio de Bartlett (Bartlett, 1937).

Para determinar la curva de crecimiento se realizó un análisis de regresión no lineal a partir de la edad y altura de la planta. Se utilizaron los modelos; Logístico (Nelder, 1961): $Y = a / (1 + b \cdot \exp(-c \cdot T))$, donde: Y es el crecimiento del organismo al tiempo t ; a es el crecimiento máximo asintótico esto es cuando t tiende al infinito; b es el parámetro de curvatura que expresa qué tan rápido alcanza el crecimiento máximo o tiempo de retraso; c = tasa de crecimiento; T = tiempo en días.

Gompertz (Laird, 1965): $Y = a \cdot \exp(-b \cdot \exp(-c \cdot T))$, donde Y es la variable de respuesta al tiempo (t); a es el valor del máximo crecimiento y además determina un punto asintótico; b = número positivo que desplaza el modelo a la izquierda o derecha; c = establece la tasa intrínseca de crecimiento.

Bertalanffy (Bertalanffy, 1957): $Y = a \cdot \exp(1 - b \cdot \exp(-c \cdot T))$, donde Y es la longitud del individuo al tiempo (t); a es la longitud máxima del individuo (asíntota máxima); c es el parámetro de curvatura que expresa qué tan rápido la longitud alcanza su valor máximo; T es el tiempo.

Gompertz (Laird, 1965): $Y = a \cdot \exp(-b \cdot \exp(-c \cdot T))$, where Y is the time response variable (t); a is the value of maximum growth and also determines an asymptotic point; b = positive number that moves the model to the left or right; establishes the intrinsic rate of growth.

Bertalanffy (Bertalanffy, 1957): $Y = a \cdot \exp(1 - b \cdot \exp(-c \cdot T))$, where Y is the length of the individual at time (t); a is the maximum length of the individual (maximum asymptote); c is the curvature parameter that expresses how fast the length reaches its maximum value; T = is time.

It was considered for model adjustment that, had high R^2 value, high significance, low standard error of parameters and estimation, lower mean square of error and significant input of the parameters of the equation. To define the factors that determined efficiency in *in vitro* germination, the multivariate factorial technique was used, using the Main Components method for the extraction of factors and Varimax to minimize the factors that define the model (Torres *et al.*, 1993).

Results and discussion

Germination and associated indices

The wet media culture led to the highest percentage (100 %) germination for $P \leq 0.05$, followed by water-agar 0.8 % and MS media. For the DPG variables, TMG and IVG the mean MSG was significantly lower ($P \leq 0.05$) compared to the rest of the

Se consideró para el ajuste del modelo que, presentara alto valor de R^2 , alta significación, bajo error estándar de los parámetros y de estimación, menor cuadrado medio del error y aporte significativo de los parámetros de la ecuación. Para definir los factores que determinaron la eficiencia en la germinación *in vitro*, se utilizó la técnica multivariante factorial, empleando el método de Componentes Principales para la extracción de los factores y el Varimax para minimizar los factores que definen el modelo (Torres *et al.*, 1993)

Resultados y discusión

Germinación e índices asociados

El medio de cultivo húmedo propició el mayor porcentaje (100 %) en la germinación acumulada para $P \leq 0,05$, seguido por los medios Agua-Agar 0,8 % y MS. Para las variables DPG, TMG e IVG el medio MSG se mostró significativamente inferior ($P \leq 0,05$) en comparación con el resto de los medios, en el IG el medio húmedo volvió a diferenciarse ($P \leq 0,05$) del resto de los tratamientos (4,85), y MSG permaneció inferior (1,47) ($P \leq 0,05$) (cuadro 1).

En la germinación acumulada en condiciones *in vitro*, Aguirre (2017) obtuvo valores de 26,7 %, por afectaciones con hongos y un 28,95 % de contaminación, utilizando como método la inmersión de semillas en soluciones de NaClO al 5 % y Tween durante seis minutos. Avila-Treviño *et al.* (2017) lograron 95,5 % de germinación acumulada sobre medio MS, combinando la inmersión

media, in the IG the wet medium was again differentiated ($P \leq 0,05$) from the rest of the treatments (4.85), and MSG remained lower (1.47) ($P \leq 0,05$) (table 1).

In cumulative germination under *in vitro* conditions Aguirre (2017) obtained values of 26.7 %, for fungal affections and 28.95 % of contamination, using as a method the immersion of seeds in 5 % NaClO solutions and Tween for six minutes. Avila-Treviño *et al.* (2017) achieved 95.5 % cumulative germination on MS medium, combining seed immersion for 15 minutes in 70 % ethanol, Tween 20 and a commercial bleach solution, the results about the effect of the medium were inconclusive. The accumulated germination value for MS and disinfection time were similar to those in this study. The time of immersion of seeds in disinfectant solutions has a significant effect on the reduction and/or eradication of pathogens in the *in vitro* cultivation of Moringa seeds.

When evaluating the indices associated with germination, for IG the higher values were located in the wet media, denoting uniformity in the germinative quality of the collected seeds.

The values of IVG are similar to those obtained by Luna (2019) (3.92) in immersion bioreactors, affirming the high hygroscopic capacity of the collected Moringa seeds. The DPG and TMG corresponded, for the first variable, with the background described by Marcos-Filho (2010) for *in vitro* germination of Moringa, while for TMG Luna (2019) it obtained 13 days and

de las semillas durante 15 minutos en etanol 70 %, Tween 20 y una solución de lejía comercial, los resultados acerca del efecto del medio no fueron concluyentes. El valor de la germinación acumulada para MS y tiempo de desinfección fueron similares a los del presente estudio. El tiempo de inmersión de las semillas en las soluciones desinfectantes tiene un efecto importante sobre la disminución y/o erradicación de agentes patógenos en el cultivo *in vitro* de semillas de Moringa.

Valdés-Rodríguez *et al.* (2018a) in the South Center of Mexico with acclimated ecotypes obtained values of 5,9, which results in the physiological quality of the seeds collected for this study.

The culture medium has a direct effect on germination because of the high moisture content that characterizes them, however, the germination capacity will depend on the characteristics of the seed. The seeds of Moringa are characterized by being hygroscopic, so it responds positively to moisture, as long as it

Cuadro 1. Germinación de semillas de *M. oleifera* en condiciones *in vitro* en diferentes medios de crecimiento.

Table 1. Germination of *M. oleifera* seeds under *in vitro* conditions in different growth media.

Medio de cultivo	Germinación Acumulada (%)	DPG (días)	TMG (días)	IVG	IG	Contaminación (%)
MSG	93,9 c	7,5c	1,37 c	0,95c	1,47 c	0,00 (1,11)
MS	96 b	5ab	2,29 ab	2,38 ab	3,25 b	0,004 (1,12)
Agua-Agar 0,8%	94b c	5ab	2,24 ab	2,47 ab	3,32 b	0,00 (1,11)
Medio Húmedo	100 a	4,5 a	2,98 a	3,71 a	4,85 a	0,00 (1,11)
±EE	7,78	0,54	0,115	0,33	0,2	0,0000016
F	0,55	3,24	0,57	1,08	0,96	1,2
P	0,020	0,046	0,023	0,038	0,043	0,35

Letras distintas dentro de una misma columna, representan diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0,05$). Valores entre paréntesis corresponden a promedios transformados según Arcosen ($x+0,90$).

Different letters within the same column represent significant differences according to Tukey ($P \leq 0,05$). Values in parentheses are processed according Arcosen averages ($x + 0,90$).

Al evaluar los índices asociados a la germinación, para el IG los valores más altos se ubicaron en el medio húmedo, denotando uniformidad en la calidad germinativa de las semillas colectadas. Los valores del IVG son similares a los obtenidos por Luna (2019) (3,92) en biorreactores de inmersión, afirmando

does not reach excess and causes the loss of the integrity of the membranes (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2015).

With moisture incorporation from the medium into the seed, specific enzymes (amylase and phosphorylase) are activated, triggering the reduction of carbohydrates to the emergence

la alta capacidad higroscópica de las semillas de Moringa colectadas. Los DPG y TMG, correspondieron, para la primera variable, con los antecedentes descritos por Marcos-Filho (2010) para geminación *in vitro* de la Moringa, mientras que para la TMG Luna (2019) obtuvo 13 días y Valdés-Rodríguez *et al.* (2018a) en el centro Sur de México con ecotipos climatizados obtuvieron valores de 5,9, lo que redundó en la calidad fisiológica de las semillas colectadas para el presente estudio.

El medio de cultivo tiene un efecto directo sobre la germinación por el alto contenido de humedad que los caracteriza, sin embargo, la capacidad de germinación va a depender de las características de la semilla. Las semillas de la Moringa se caracteriza por ser higroscópica, por lo que responde de forma positiva a la humedad, siempre y cuando no llegue al exceso y provoque la pérdida de la integridad de las membranas (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2015).

Con la incorporación de la humedad del medio al interior de la semilla, se activan enzimas específicas (amilasa y fosforilasa), desencadenando la reducción de los hidratos de carbono para la emergencia de la primera radícula, contribuyendo el medio húmedo a que los mayores valores de germinación e índices relacionados se concentraran en el mismo. Otra condición que define la germinación según Copeland (1995) y Valdés-Rodríguez *et al.* (2018b) son las condiciones de crecimiento de la planta donadora que definen la calidad de la semilla por la presiones ambientales de medio donde crece.

En este sentido, Matos-Ruiz *et al.* (2016) obtuvieron valores de germinación

of the first radicle, contributing the wet environment to the higher germination values and related indices to concentrate on it. Another condition that defines germination according to Copeland (1995) and Valdés-Rodríguez *et al.* (2018b) are the growing conditions of donor plant that define the quality of the seed by the environmental pressures of the medium where it grows.

In this sense, Matos-Ruiz *et al.* (2016) obtained cumulative germination values between 31.35 and 54.24 % in Moringa seeds grown *in vitro* for 21 days in a semi-solid medium without deepening these authors, in morphological characteristics of the seed and their effect on germination.

The BIPLLOT (figure 1) shows the variables related to the seedling germination, growth and morphology process. Of which, it was considered according to the criterion of Varela and Castillo (2005) that, the furthest from the origin are the ones that made the least contributions to the germination process, and the variables close to the origin of BIPLLOT are the most contributed.

The closest variable to BIPLLOT was the weight of seed, several works have linked germination, seedling growth and development with this variable using regression equations (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2014; 2018b), also in other genera such as *Ricinus communis* L. (Ahmed *et al.* 2011), however, regression coefficients were low and numerically did not justify the biological meaning of the weight of the seed with germination, growth and development of seedlings.

acumulada comprendidos entre 31,35 y 54,24 % en semillas de *Moringa* cultivadas *in vitro* durante 21 días en un medio semisólido sin profundizar estos autores, en las características morfológicas de las semilla y su efecto en la germinación.

En el BIPLLOT (figura 1) se muestran las variables relacionadas con el proceso de germinación, crecimiento y morfología de plántulas. De las cuales, se consideró según el criterio de Varela y Castillo (2005) que, las más alejadas del origen son las que menos aportes hicieron al proceso de germinación, y las variables próximas al origen del BIPLLOT las de mayor contribución.

Component one linked the morphological variables of the seed (weight, length and width) with the leafy development of the plant and with physiological indicators describing germination in a positive convergence, to explain in 56.66 % the cumulative variance (figure 1). The energy reserves that possess the seeds are linked to the weight of the seed, allowing it to germinate rapidly, adequate growth and development of the seedling (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2018b).

Component two with 14.24 % made it possible for 79.90 % of the cumulative variance to be explained in conjunction with component one. Thickness of seed

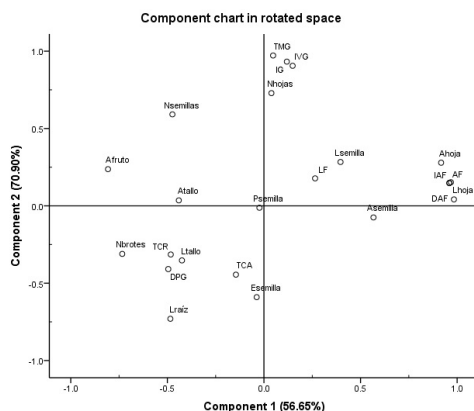


Figura 1. BIPLLOT resultante del análisis de componentes principales del proceso de germinación, brotación y desarrollo de vitroplantas de *M. oleifera*. Esemilla: Espesor de la semilla; Psemilla: Peso de la semilla; TCA: Tasa de Crecimiento Absoluto; TCR: Tasa de Crecimiento Relativo; Lraíz: Largo de la raíz; Ltallo: Largo del tallo; DPG: Días para germinar; Asemilla: Ancho de la semilla; Atallo: Ancho del tallo; Afruto: Ancho del fruto; Nsemillas: Número de semillas; Nhojas: Número de hojas; IG: Índice de germinación; IVG: Índice de la velocidad de germinación; TMG: Tiempo medio para germinar; Lsemilla: Largo de semilla; LF: Largo de fruto; Asemilla: Ancho de semilla; Lhoja: Largo de hoja; DAF: Duración del área foliar; AF: Área foliar; IAF: Índice de área foliar; Ahoja: Ancho de hoja.

Figure 1. BIPLLOT resulting from the analysis of main components of the germination, sprouting and development process of *M. oleifera* vitroplants. Esemilla: Thickness of the seed; Psemilla: Weight of the seed; TCA: Absolute Growth Rate; TCR: Relative Growth Rate; Root: Length of the root; Ltallo: Length of the stem; DPG: Days to germinate; Asemilla: Seed width; Stem: Stem width; Afruto: Width of the fruit; Nsemillas: Number of seeds; Nhojas: Number of leaves; GI: germination index; IVG: germination speed index; TMG: Average time to TMG: Average time to germinate; Lsemilla: Seed length; LF: Fruit length; Asemilla: Seed width; Lhoja: Leaf length; DAF: Duration of the leaf area; AF: Leaf area; IAF: Index of leaf area; Leaf: Leaf width.

La variable más próxima al BIPLLOT fue el peso de la semilla, varios trabajos han relacionado la germinación, crecimiento y desarrollo de la plántula con esta variable mediante ecuaciones de regresión (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2014; 2018b), también en otros géneros como el *Ricinus communis* L. (Ahmed *et al.* 2011), sin embargo, los coeficientes de regresión de determinación fueron bajos y numéricamente no justificaron el significado biológico que tiene el peso de la semilla con la germinación, crecimiento y desarrollo de las plántulas.

La componente uno vinculó las variables morfológicas de la semilla (peso, largo y ancho) con el desarrollo foliar de la planta y con indicadores fisiológicos que describen la germinación en una convergencia positiva, para explicar en un 56,66 % la varianza acumulada (figura 1). Las reservas energéticas que posean las semillas se vinculan con el peso de esta, posibilitándole una rápida germinación, adecuado crecimiento y desarrollo de la plántula (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2018b). La componente dos con un 14,24 % posibilitó que se lograra explicar en conjunto con la uno el 79,90 % de la varianza acumulada. Convergió de forma negativa el espesor de la semilla con la longitud de la raíz, variables fisiológicas que describen el crecimiento, la germinación, morfología del tallo y número de brotes. Las diferencias pueden explicarse por los diferentes procesos metabólicos intermedios que interfieren entre las diferentes etapas de la germinación

negatively converged with the root length, physiological variables that describes growth, germination, stem morphology and number of shoots. Differences can be explained by the different intermediate metabolic processes that interfere between the different stages of germination to root expansion and morphological transformations of the seedling, the above-mentioned processes are biologically staggered, and therefore statistically not all can be connected.

Growth and development of emerging seedlings

In assessing the emerging plants that grew on the proposed culture media (table 2), it was obtained that the media type changed significantly ($P \leq 0.05$) the number of shoots, with MS and MSG media most likely stimulating their occurrence ($P \leq 0.05$) with respect to Water-Agar media 0.8 % and wet. For the number of leaves, it was the latter media and the MS that favored their appearance ($P \leq 0.05$), with respect to the MSG, however, this medium, in conjunction with the water-agar media 0.8 % and wet stimulated ($P \leq 0.05$) the length of the main root, but without increasing ($P \leq 0.05$) the number of secondary roots.

For the number of leaves, a variable highly appreciated in the cultivation of Moringa being contained in these the main antioxidant constituents, crude protein, vitamins and secondary compounds with nutraceutical value, the culture media contributed to its appearance, however, it should be mentioned that in the medium Water-Agar 0.8% and wet medium was

hasta la expansión radicular y transformaciones morfológicas de la plántula, los procesos mencionados están biológicamente escalonados, y, por tanto, estadísticamente no se pueden relacionar todos.

Crecimiento y desarrollo de las plántulas emergidas

Al evaluar las plantas emergidas que crecieron sobre los medios de cultivos propuestos (cuadro 2), se obtuvo que el tipo de medio modificó de forma significativa ($P \leq 0,05$) el número de brotes, siendo los medios MS y MSG los que mayormente estimularon su aparición ($P \leq 0,05$) respecto a los medios Agua-Agar 0,8 % y húmedo. Para el número de hojas, fueron estos últimos medios y el MS los que favorecieron su aparición ($P \leq 0,05$), respecto al MSG, sin embargo, este medio, en conjunto con los medios Agua-Agar 0.8 % y húmedo estimularon ($P \leq 0,05$) la longitud de la raíz principal, pero sin incrementar ($P \geq 0,05$) el número de raíces secundarias.

Para el número de hojas, variable muy apreciada en el cultivo de la *Moringa* al estar contenidas en estas los principales constituyentes antioxidantes, proteína bruta, vitaminas y compuestos secundarios con valor nutracéutico, los medios de cultivos contribuyeron a su aparición, sin embargo, se debe mencionar que en medio Agua-Agar 0,8 % y medio húmedo se observó necrosis después de expandirse, aunque otro brote con nuevas hojas la sustituía. Este fenómeno se relaciona con las carencias de minerales en el medio (Poothong *et al.*, 2018), no siendo recomendable su uso para el crecimiento y desarrollo de *in vitro* plantas de *Moringa*.

observed necrosis after expanding, although another outbreak with new leaves the substitution was observed. This phenomenon is related to mineral deficiencies in the environment (Poothong *et al.*, 2018), not being recommended for its use for the growth and development of *Moringa in vitro* plants.

To stimulate shoots and leaves appearance, Poothong *et al.* (2018) evaluated different formulations of the MS medium in the multiplication phase of *Stevia rebaudiana* Bertoni and observed a close relationship between the micro mineral content and the increase of the fractions mentioned, which was observed in this study in the MS and MSG media for both variables, although for the length of the root the MS medium had no representativeness with respect to MSG, stimulated by differences in quantity and variety of nutrients.

The analysis of plant growth dynamics on different culture media by nonlinear regressions is the first reference to the growth of *M. oleifera* seedlings under *in vitro* conditions (figure 2).

The model that best described the growth of plants from the biological point of view on medium MS and Water-Agar 0.8 % was the Logistics ($P \leq 0.001$) (figure 2 A₁ and A₂, respectively), noting in the average MS maximum growth of 43.17 mm with rates of 0.47 mm.day⁻¹, while the Bertalanffy adjusted ($P \leq 0.0001$) to those that grew on MSG (figure 2 C₂) with rates of 0.07 mm.day⁻¹, for the control plants the Gompertz and Bertalanffy models were very similar

Cuadro 2. Influencia de medios de cultivos al desarrollo morfológico de plántulas germinadas en condiciones *in vitro*.

Table 2. Influence of culture media on the morphological development of germinated seedlings under *in vitro* conditions.

Medios	LT (mm)	GT (mm)	¹ NB (U)	² NH (U)	³ LH (mm)	AH (mm)	LR (mm)	NRs (U)
MSG	53,98±28,5	2,14±0,5	0,20±0,5 a (2,68)	4,8±2,2 b (3,11)	12,77±10,1 (3,57)	11,78±10,2	76,92±17,6 a	17,28±5,4
MS	65,58±15,5	2,29±0,5	0,16±0,6 a (2,67)	7,08±1,2 a (3,47)	10,95±2,9 (3,43)	8,78±2,3	48,69±16,3 b	18,83±3,2
Agua-Agar 0,8 %	53,79±12,4	1,68±0,4	0,04±0 b (2,64)	6,62±0,7 ab (3,40)	10,27±2,3 (3,33)	6,23±2,3	59,11±12,8 ab	16,87±7,3
Medio Húmedo	53,47±7,7	1,84±0,5	0,04±0 b (2,64)	5,50±0,9 ab (3,23)	8,18±3,5 (2,95)	5,01±2,3	59,84±38,3 ab	19±11,4
±EE	9,74	0,017	0,017	0,008	0,01	2,06	0,047	0,23
F	0,806	2,64	2,64	4,93	0,726	1,66	4,28	0,22
P	0,49	0,64	0,04 4	0,005	0,54	0,19	0,01	0,87

Letras distintas dentro de una misma columna, representan diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0,05$). LT: Longitud del tallo; GT: Grosor del tallo; NB: Número de brotes; NH: Número de hojas; LH: Longitud de hojas; AH: Ancho de hoja; LR: Longitud de raíz; NRs: Número de raíces secundarias. ¹Valores entre paréntesis corresponden a promedios transformados según $\sqrt{x+5}$; ² promedios transformados según $\sqrt{x+3}$; ³ promedios transformados según $\sqrt{x+1}$.

Different letters within the same column, represent significant differences according to Tukey-test, ($P \leq 0,05$). LT: stem length; GT: Stem thickness; NB: Number of outbreaks; NH: Number of sheets; LH: Leaf length; AH: Sheet width; LR: Root length; NRs: Number of secondary roots. ¹Values in parentheses correspond to averages transformed according to $\sqrt{x+5}$; ²averages transformed according to $\sqrt{x+3}$; ³averages transformed according to $\sqrt{x+1}$.

Para estimular la aparición de brotes y hojas Poothong *et al.* (2018) evaluaron diferentes formulaciones del medio MS en la fase de multiplicación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y observaron una estrecha relación entre el contenido de micro minerales y el incremento de las fracciones mencionadas, lo cual se observó en el presente estudio en los medios MS y MSG para ambas variables, aunque para el largo de la raíz el medio MS no tuvo representatividad respecto al MSG, estimulado por las diferencias en cantidad y variedad de nutrientes.

El análisis de la dinámica de crecimiento de las plantas sobre los diferentes medios de cultivos mediante regresiones no lineales, constituyen la primera referencia acerca del crecimiento de plántulas de *M. oleifera* en condiciones *in vitro* (figura 2).

in the growth description (figure 2 B_4 and C_4). According to the fit of the models, the differences are in the composition of the MS and MSG culture media.

From the chemical composition, the MS and MSG media differ in the concentration of some microelements (H_3BO_4 ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ and $CoCl_2 \cdot 6H_2O$) where the MS media overcomes MSG, while in the rest ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; KI and $NaMO_4 \cdot 2H_2O$) the MSG has higher concentration (Sharry *et al.* 2015). Generally, minerals contribute and intervene in the structuring and conformation of enzymes, giving them the properties that identify and characterize them, in this way the plants that grow in MSG media have a greater possibility of photosynthetic efficiency than those that grow in the rest of the

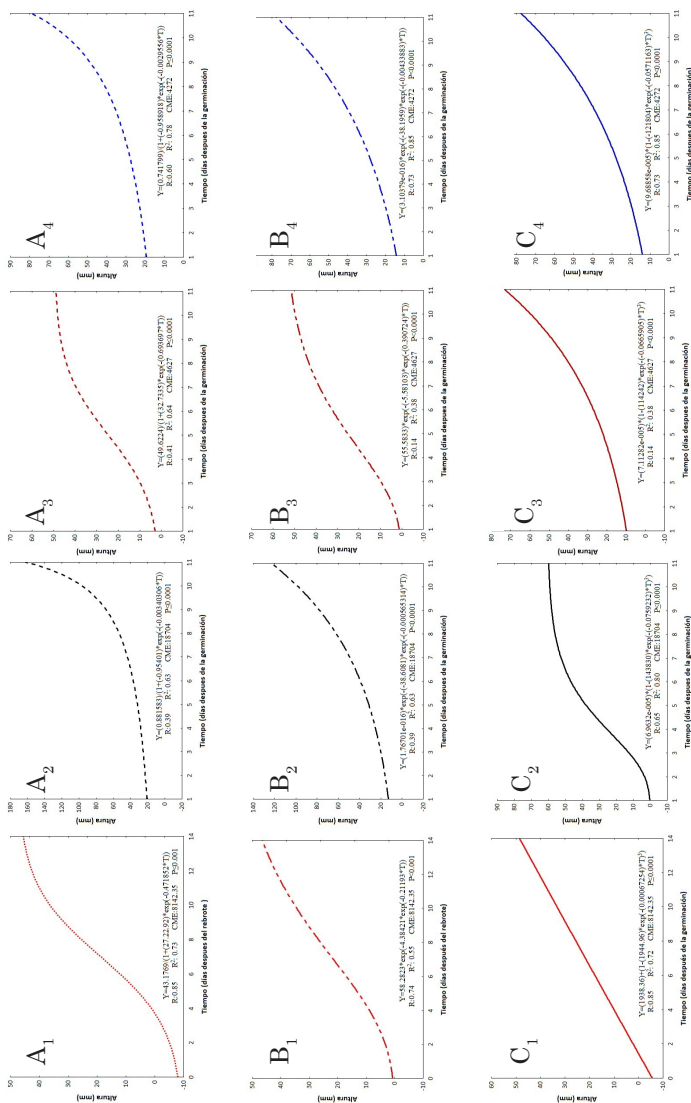


Figura 2. Curvas de crecimiento de plántulas de *M. oleifera* germinadas sobre diferentes medios de crecimiento. MS (A₁-C₁), MSG (A₂-C₂), Agua-Agar 0,8 % (A₃-C₃) y húmedo (A₄-C₄); ajustada a los modelos: (A) Logístico; (B) Gompertz; (C) Bertalanffy.

Figure 2. Growth curves of germinated *M. oleifera* seedlings on different growth media. MS (A₁-C₁), MSG (A₂-C₂), Water-Agar 0,8 % (A₃-C₃) and wet (A₄-C₄); adjusted to the models: (A) Logistics; (B) Gompertz; (C) Bertalanffy.

El modelo que mejor describió el crecimiento de las plantas desde el punto de vista biológico sobre medio MS y Agua-Agar 0,8 % fue el Logístico ($P \leq 0,001$) (figura 2 A₁ y A₃, respectivamente), señalando en medio MS crecimiento máximo de 43,17 mm con tasas de 0,47 mm.día⁻¹, mientras que el Bertalanffy se ajustó ($P \leq 0,0001$) a aquellas que crecieron sobre MSG (figura 2 C₂) con tasas de 0,07 mm.día⁻¹, para las plantas control los modelos Gompertz y Bertalanffy fueron muy parecidos en la descripción del crecimiento (figura 2 B₄ y C₄). Atendiendo al ajuste de los modelos, las diferencias estriban en la composición de los medios de cultivos MS y MSG.

Desde la composición química, los medios MS y MSG se diferencian en la concentración de algunos microelementos (H₃BO₄; CuSO₄ 5H₂O y CoCl₂ 6H₂O) donde el medio MS supera en cantidad al MSG, mientras que en el resto (MnSO₄ 4H₂O; ZnSO₄ 7H₂O; KI y NaMO₄ 2H₂O) el MSG posee mayor concentración (Sharry *et al.* 2015). De forma general los minerales contribuyen e intervienen en la estructuración y conformación de las enzimas, otorgándoles las propiedades que las identifican y caracterizan, de esta manera las plantas que crecen en medio MSG poseen mayor posibilidad de eficiencia fotosintética que las que crecen en el resto de los medios, debido a que el medio MSG los microelementos que lo constituyen intervienen en la activación enzimática, específicamente en la cadena de transporte de electrones del fotosistema II, lo que dota a las plantas de mayor eficiencia fotosintética.

media, because in MSG media, microelements that constitute it intervene in the enzymatic activation, specifically in the electron transport chain of photosystem II, which gives plants higher photosynthetic efficiency.

The availability of microelements and vitamins contained in the MS media enables rapid growth, and equally to the MSG media with respect to macroelement content. The MSG media has higher amounts of microelements and vitamins that allow the plant cell to increase the metabolic rate, and which according to what is observed in figure C₂, is used for the conversion of tissues by the prolonged period of delay around the inflection point. Accelerated growth by the high availability of nutrients in the environment requires the plant to have an energy expenditure, but also leads to a rapid depletion of the environment, considering for the growth of Moringa seedlings the MS media more suitable than MSG, although it is also exhausted, it leads the plant a higher height, and with it, greater availability of plant tissue for multiplication.

For plants that grew in water-agar medium 0.8 % it should be mentioned that, the composition of agar is limited to its origin as a polysaccharide of galactose and galactomannan obtained from red algae (*Echema*, *Gelidium*, *Gracilaria*), containing 70 % agarous and 30 % agaropectin, the rest of the constituents are not defined (Sharry *et al.*, 2015), these conditions led to the plants manifesting accelerated

La disponibilidad de microelementos y vitaminas contenidos en el medio MS posibilita un rápido crecimiento, y de forma equitativa al medio MSG respecto al contenido de macroelementos. El medio MSG posee mayores cantidades de microelementos y vitaminas que le permiten a la célula vegetal incrementar la tasa metabólica, y que según lo que se observa en la figura C₂, es empleado para la reconversión de tejidos por el prolongado período de retardo alrededor del punto de inflexión. Un acelerado crecimiento por la alta disponibilidad de nutrientes en el medio le exige a la planta un gasto energético, pero también propicia un rápido agotamiento del medio, considerándose para el crecimiento de plántulas de *Moringa* el medio MS más adecuado que el MSG, aunque de igual forma se agote, propicia a la planta una mayor altura, y con ello mayor disponibilidad de tejido vegetal para la multiplicación.

Para las plantas que crecieron en medio Agua-Agar 0,8 % se debe mencionar que, la composición del agar se circunscribe a su origen como polisacárido de galactosa y galactomanano que se obtiene de las algas rojas (*Echema*, *Gelidium*, *Gracilaria*), conteniendo 70 % de agarosa y un 30 % de agarpectina, el resto de los constituyentes no están definidos (Sharry *et al.*, 2015), estas condicionantes propiciaron que las plantas manifestaran un crecimiento acelerado (0,69 mm.día⁻¹) en un principio tal como lo describe el modelo Logístico, pero aún deficiente hasta los siete días según el punto de inflexión (37.85 mm). Posteriormente,

growth (0.69 mm.day⁻¹) in principle as described in the Logistics model, but still deficient up to seven days according to the turning point (37.85 mm). Subsequently, linear growth was observed from the eight days by the shortage of nutrients in the environment or perhaps factors related to the quality of the media.

The above may be due to what was raised by Sharry *et al.* (2015) those who mention that the quality of the agar will depend on the time of year when the algae was collected, the level of contaminants, the manufacturing process and the way in which the product was purified, considering that any level of impurities in the agar could have an effect on the response of *in vitro* culture. However, it was not evaluated in this paper.

Plants that germinated in a wet culture showed slow and steady growth, with a rate of 0.004 and 0.05 mm.day⁻¹ according to the Gompertz and Bertalanffy models, respectively, these models best described the growth process. Gompertz's model described slow growth at the beginning, but it accelerates after the turning point to slow down again, as seen in figures B₄, while Bertalanffy's model (figure 2 C₄), associates this type of growth with catabolism roles but without stopping growth (Bertalanffy, 1957).

Multiplication

In the multiplication process only the MS and MSG media yielded results. The MSG medium turned out to be superior (F=7.6123; P=0,010686; EE=0.13) in the multiplication of explants with

se observó un crecimiento lineal a partir de los ocho días por la escases de nutrientes del medio o quizás factores relacionados con la calidad de este.

Lo anterior puede deberse a lo señalado por Sharry *et al.* (2015) quienes mencionan que la calidad del agar va a depender de la época del año en que el alga fue colectada, el nivel de contaminantes, el proceso de manufactura y la manera en que el producto fue purificado, considerando que, cualquier nivel de impurezas en el agar pudo tener efecto en la respuesta del cultivo *in vitro*. No obstante, no fue evaluado en el presente trabajo.

Las plantas que germinaron en medio de cultivo húmedo mostraron un crecimiento lento y constante, con una tasa de 0,004 y 0,05 mm.día⁻¹ según los modelos de Gompertz y Bertalanffy, respectivamente, estos modelos fueron los que mejor describieron el proceso de crecimiento. El modelo de Gompertz describió un crecimiento lento al inicio, pero que se acelera después del punto de inflexión para ralentizarse nuevamente, tal cual se observa en la figuras B4, mientras que el modelo de Bertalanffy (figura 2 C₄), asocia este tipo del crecimiento con roles catabolismo pero sin detenerse el crecimiento (Bertalanffy, 1957).

Multiplicación

En el proceso de multiplicación solo los medios MS y MSG arrojaron resultados. El medio MSG resultó ser superior (F=7,6123; P=0,010686; ± EE=0,13) en la multiplicación de explantes con 31,54 ± 20,66 %, respecto al MS (3,87 ± 9,10 %).

31.54 ± 20.66 %, compared to MS (3.87 ± 9.10 %).

Jun-jie *et al.* (2017) evaluated different growth promoters in Moringa vc PKM-1 leaf explants, observing with the application of 6-BA, between 20 and 73 % of explants depending on the decrement of the dose used, however, the higher percentage observed it when combined three growth regulators (6-benciladenine (BA); kinetine (KT); naphthalenacetic acid (AN)).

Responses based on individual or combined regulators are not clarified yet, in the criterion of Montalbán *et al.* (2013) is due to different cellular activities that, during the regeneration of outbreaks are controlled by internal factors, including cytokinin levels, which cause internal chemical and structural differences, leading to different responses when presented in the environment.

Regarding the results of this study, similar variations in the multiplication process were observed in chrysanthemum (Naing *et al.*, 2014); *Jatropha curcas* (Zhang *et al.*, 2013) and Moringa (Jun-jie *et al.*, 2017), where they obtained similar results with the addition of 6-BA, while Al-Khalifah and Shanavaskhan (2017) reported amounts of 2.5 M of 6-BA as optimal for inducing sprouting. Considering that the amount of 6-BA (4.44 µL.mL⁻¹) applied in this study positively promotes the production of explants in apical portions of Moringa seedlings.

Jun-jie *et al.* (2017) evaluaron diferentes promotores del crecimiento en explantes de hojas de Moringa vc PKM-1, observando con la aplicación de 6-BA, entre 20 y 73 % de explantes en función del decremento de la dosis que se empleó, sin embargo, el mayor porcentaje lo observaron cuando combinaron tres reguladores del crecimiento (6-benciladenina (BA); kinetina (KT); ácido naftalenacético (AN)).

Las respuestas en función de reguladores de forma individual o combinados aún no se esclarece, en el criterio de Montalbán *et al.* (2013) se debe a las diferentes actividades celulares que, durante la regeneración de brotes se controlan por factores internos, incluidas los niveles de citoquininas, que causan diferencias químicas y estructurales internas, conllevando a diferentes respuestas cuando se presentan en el medio.

Respecto a los resultados del presente estudio, variaciones similares en el proceso de multiplicación fueron observadas en crisantemo (Naing *et al.*, 2014); *Jatropha curcas* (Zhang *et al.*, 2013) y Moringa (Jun-jie *et al.*, 2017), donde obtuvieron resultados similares con la adición de 6-BA, mientras que Al-Khalifah and Shanavaskhan (2017) señalaron cantidades de 2,5 μM de 6-BA como óptimas para inducir la brotación. Considerándose que la cantidad de 6-BA (4,44 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) aplicada en el presente estudio promueve de manera positiva la producción de explantes en porciones apicales de plántulas de Moringa.

Conclusions

MS and MSG media do not provide *M. oleifera* seed germination process under *in vitro* conditions. It is indispensable in the multiplication phase with the addition of 4.44 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ of 6-BA and the use of MS and MSG media. The culture medium modifies the growth of vitroplants.

Acknowledgements

The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) is thanked for the scholarship No. 939024 granted to JLLR. To M. C. Margarito Rodríguez Alvarez, for the technical support provided.

End of English Version

Conclusiones

Los medios MS y MSG no aportan al proceso de germinación de semillas de *M. oleifera* en condiciones *in vitro*. Es indispensable en la fase de multiplicación con la adición de 4,44 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de 6-BA y el uso de los medios MS y MSG. El medio de cultivo modifica el crecimiento de las vitroplantas.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 939024 otorgada a JLLR. Al M.C. Margarito Rodríguez Álvarez, por el apoyo técnico brindado.

Literatura citada

- Aguirre, L., E., 2017. Establecimiento de la primera etapa de un cultivo *in vitro* de moringa (*Moringa oleifera*). Rev. Nova. 3: 59 - 69.
- Ahmed, N., Khan, D., Zaki, M. J., and Al, E. T. 2011. Seed and seedling size relationship in Castor (*Ricinus communis* L.). Int. J. Biol. Biotech. 8(4): 613 - 622.
- Al-Khalifah, N. S., y Shanavaskhan, A. E. 2017. *Moringa oleifera* Lam., a promising crop species for arid conditions of Saudi Arabia and *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, a native wild species for crop improvement. Act. Hort. 1158: 159-170. Disponible en: <https://doi.org/10.17660/ActaHort.2017.1158.19>.
- Avila-Treviño, J. A., Muñoz-Alemán, J. M., Pérez-Molphe-Balch, E., Rodríguez-Sahagún, A., and Morales-Domínguez, J. F. 2017. *In vitro* propagation from bud and apex explants of *Moringa oleifera* and evaluation of the genetic stability with RAMP marker. South African J. of Bot. 108: 149 - 156. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.003>.
- Bartlett, M. S. 1937. Properties of Sufficiency and Statistical Test. Series A-Mat. and Phys. Proc. R. Soc. London, Ser. A, 160: 268-282.
- Bertalanffy, L. Von. 1957. Quantitative laws in metabolism and growth. The Quart. Rev.of Biol. 32(3): 333 - 406.
- Conger, B.V. 2018. Cloning Agricultural Plants Via *In Vitro* Techniques. (B. V Conger, Ed.). Cloning Agricultural Plants Via *In Vitro* Techniques. Tennessee. 300 p. Disponible en: <https://doi.org/10.1201/9781351070706>.
- Copeland, L. O. y M. B. M. 1995. Principles of Seed Science and Technology. (C. Hall., Ed.) (Third edit). NewYork, USA. 325 p.
- Ellis, R. H., and Roberts, E. H. 1980. Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. Ann. of Bot. 45(1): 13 - 30. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085797>.
- Gamborg, O. L. 1970. The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Culture. Plant Phys. 45(4): 372 - 375. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.45.4.372>.
- García-López, J. J. 2016. *Moringa oleifera* Lam.: Biología, Botánica, Propiedades Nutricionales y Medicinales. Universidad de Sevilla. España. 46 pp.
- Gardner, F. P., Pearce, R. B., and Mitchell, R. L. 2003. Physiology of Crop Plants. (F. P. Gardner, Ed.) (1st ed.). Iowa: Blackwell publishing company. 150 p.
- Hunt, R., and Hunt, R. 1990. Absolute growth rates. Basic Growth Analysis. 17-24. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-010-9117-6_2.
- Jun-jie, Z., Yue-sheng, Y., Meng-fei, L., Shu-qi, L., Yi, T., Han-bin, C., and Xiao-yang, C. 2017. An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). Ind. Crops and Prod. 103: 59 - 63. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.028>.
- Laird, A. K. 1965. Dynamics of relative growth. Growth. 29:249 - 263.
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., and Jain, M. S. 2013. Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. eBook (M. Lambardi, E. A. Ozudogru, and M. S. Jain, Eds.). New York. 488 p. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8>.
- Lim, K. B., Kwon, S. J., Lee, S. I., Hwang, Y. J., and Naing, A. H. 2012. Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of chrysanthemum. Hort. Env. and Biotech. 53(4): 329 - 335. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13580-012-0063-x>.
- Luna, C. V. 2019. Establecimiento de un método eficiente de estandarización de la germinación *in vitro* de *Moringa oleifera* (Moringaceae). Act. Bot. Mex. (126). Disponible en: <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1496>.

- Marcos Filho, J. 2010. Sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas (SVIS) para avaliação do vigor de sementes. Workshop Bras. Sobre Controle de Qualidade de Sementes. <http://www.jstor.org/stable/2527498>. Society, 17(1): 89 - 110.
- Massey, F. J. (1951). The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *J. of the Am. Stat. Ass.* 46(253): 68 - 78. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01621459.1951.10500769>.
- Matos-Ruiz, A., Capote-Betancourt, I., Pérez-Martínez, A., Pina-Morgado, D., Vives-Hernández, K., Daquinta-Gradaille, M., y Escalona-Morgado, M. 2016. Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cult. Trop.* 37(especial), 49 - 56. Disponible en: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1717.7202>.
- Montalbán, I. A., Novák, O., Rolčik, J., Strnad, M., and Moncaleán, P. 2013. Endogenous cytokinin and auxin profiles during *in vitro* organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Phys. Plant.* 148(2): 214 - 231. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01709.x>.
- Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P. J., and Muchenje, V. 2012. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat Sci.* 91(4): 441 - 447. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.029>.
- Murashige, T., and Skoog, G. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays whit tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 15: 473 - 497.
- Naing, A. H., Jeon, S. M., Han, J. S., Lim, S. H., Lim, K. B., and Kim, C. K. 2014. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*. *Comptes Rendus - Biologies*, 337(6): 383 - 390. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2014.03.005>.
- Nelder, A. J. A. 1961. The Fitting of a Generalization of the Logistic Curve Published by: International Biometric Society Stable URL :
- Nouman, W., Siddiqui, M. T., Basra, S. M. A., Farooq, H., Zubair, M., and Gull, T. 2013. Biomass production and nutritional quality of *Moringa oleifera* as a field crop. *Turkish J. of Agric. and Forestry.* 37(4): 410 - 419. <https://doi.org/10.3906/tar-1206-29>.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M. O., Kim, I. S., Jin, Y. W., Lee, E. K., and Loake, G. J. 2015. Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology.* 32(6): 581 - 587. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>.
- Okiki, P. A., Osibote, A. I., Balogun, O., Oyinloye, B. E., Idris, O., Olufunke, A., Olagbemide, P. T. 2015. Evaluation of Proximate , Minerals , Vitamins and Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Ado Ekiti, Nigeria. *Advan. in Biolog. Research.* 9(6): 436 - 443. Disponible en: <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2015.9.6.96112>.
- Poothong, S., Khen, T., and Chumphukam, O. 2018. In vitro mineral nutrition for improving growth and multiplication of stevia. *Agriculture and Natural Resources.* 52(5): 477 - 483. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.007>.
- Ranal, M. A., and De Santana, D. G. 2006. How and why to measure the germination process? *Rev. Bras. de Bot.* 29(1): 1 - 11. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>.
- Rubluo, A., Kartha, K. K., Mroginski, L. A., and Dyck, J. 1984. Plant Regeneration from Pea Leaflets Cultured *in vitro* and Genetic Stability of Regenerants. *J. of Plant Phys.* 117(2): 119 - 130. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(84\)80024-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(84)80024-3).
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Giridhar, P., and Ravishankar, G. A. 2012. Rapid *in vitro* regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. *3 Biotech.* 2(3): 187 - 192. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0045-9>.

- Shahzad, U., Ahmad, S., and Awan, F. S. 2014. Optimization of the microcloning system of threatened *Moringa oleifera* Lam. Pakistan J. of Agric Sci. 51(2): 459 - 467.
- Sharry, S. E., Adema, M. y Abedini, W. 2015. Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Libros de Cátedra. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. La Plata, Argentina. 240 p.
- Statsoft, I. (n.d.). Statistica. 12th version. INC., Oklajoma.
- Torres, V., López, V., and Noda, A. 1993. Example for application o multivariate techniques in different stages of the evaluation and screening of pastures speies. Multivariate analysis of variance. Cuban J. of Agric Sci. 27: 247.
- Valdés-Rodríguez, O. A., Muñoz-Gamboa, C., Pérez-Vázquez, A. y Martínez-Pacheco, L. E. 2018a. Análisis y ajuste de curvas de crecimiento de *Moringa oleifera* Lam. en diferentes ustratos. Rev. Cient. Biol. Agrop. Tuxpan. 2(2): 66 - 70. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Valdés-Rodríguez, O. A., Pérez-Vázquez, A. y Muñoz-Gamboa, C. 2018b. Efecto de peso y talla de semilla sobre plántulas de *Moringa* y *Ricinus*. Rev. Mex. de Cienc. Agríc. 9(7): 1411 - 1422. Disponible en: <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.734>.
- Valdés Rodríguez, O. A., Palacios Wassenaar, O. M., Ruíz Hernández, R. y Pérez Vázquez, A. 2018. Potencial de la asociación *Moringa* y *Ricinus* en el subtrópico veracruzano. Rev. Mex. de Cienc. Agríc. (9): 1673 -1686. Disponible en: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i9.1056>.
- Varela, M., and Castillo, J. G. 2005. Modelos con término multiplicativo. Aplicación en el análisis de la interacción genotipo ambiente. Cult. Trop. 26(3): 71 - 75.
- Zhang, C., Fu, S., Tang, G., Hu, X., and Guo, J. 2013. Factors influencing direct shoot regeneration from mature leaves of *Jatropha curcas*, an important biofuel plant. *In Vitro Cell. and Develop. Biol - Plant*. 49(5): 529 - 540. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9530-z>.