



Forestá Veracruzana
ISSN: 1405-7247
Imendizabal@uv.mx
Recursos Genéticos Forestales
México

Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas

Pérez-Martínez, Belkys Adriana; Castañeda-Garzón, Sandra Liliana
Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas
Forestá Veracruzana, vol. 19, núm. 2, 2017
Recursos Genéticos Forestales, México
Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49753656008>

Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas

Belkys Adriana Pérez-Martínez baperez@jbb.gov.co

Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis., México

Sandra Liliana Castañeda-Garzón slcastaneda@jbb.gov.co

Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis., México

Forestal Veracruzana, vol. 19, núm. 2,
2017

Recursos Genéticos Forestales, México

Redalyc: [https://www.redalyc.org/
articulo.oa?id=49753656008](https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49753656008)

Resumen: En la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis (Colombia), se desarrollan investigaciones relacionadas con la conservación *ex situ* de los recursos vegetales de flora nativa del Distrito Capital y su área de influencia. Dentro de los estudios abordados, se encuentra la presente investigación que tuvo como objetivo evaluar medios de cultivo para la germinación *in vitro* de *Pentacalia nitida* (Kunth) Cuatrec., *Ageratina gynoxoides* (Wedd.) R.M. King & H. Rob y *Pentacalia ledifolia* (Kunth) Cuatrec., especies silvestres nativas del bosque altoandino y paramuno. Los medios de cultivo se basaron en la composición modificada del medio MS (Murashige y Skoog) Enriquecido o no con suplementos orgánicos (pulpa de banano) o fitoreguladores (auxinas, citoquininas o gibberelinas). Al término del tiempo de evaluación de los porcentajes de germinación, que fue de cuatro semanas para *P. nitida* y *A. gynoxoides*, y de ocho semanas para *P. ledifolia*, se determinó que el medio MS reducido en un 50% en sus sales ($\frac{1}{2}$ MS) y suplementado con myo-inositol, vitaminas, sacarosa, GA₃ y agar fue el más indicado para semillas de *P. nitida* y *P. ledifolia*. En semillas de *A. gynoxoides* el empleo de la pulpa de banana, en lugar del GA₃, optimizó el proceso germinativo. Se considera que con los resultados de este trabajo, se puede brindar un aporte a la implementación de estrategias de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos valiosos para la conservación, reintroducción o restauración ecológica o promisoria para su aprovechamiento a nivel medicinal o industrial.

Palabras clave: *Pentacalia*, *Ageratina*, desinfección, germinación.

Abstract: At the Scientific Subdirection of the Botanical Garden of Bogotá José Celestino Mutis (Colombia), research related to *ex situ* conservation of native plant resources of the Capital District and its area of influence is developed. Within the studies addressed, is the present investigation which aimed to evaluate culture media for germination *vitro* of *Pentacalia nitida* (Kunth) Cuatrec., *Ageratina gynoxoides* (Wedd.) R.M. King & H. Rob and *Pentacalia ledifolia* (Kunth) Cuatrec., species wild native belonging to the high-Andean and paramuno ecosystem. The culture media were based in the modified composition of the MS medium (Murashige and Skoog), enriched or not organic supplements (banana pulp) or phytoregulators (auxins, cytokinins or gibberellins). At the end of the time of evaluation of the percentages of germination, which was four weeks for *P. nitida* and *A. gynoxoides*, and eight weeks for *P. ledifolia*, it was determined that the MS medium reduced by 50% in its salts (MS $\frac{1}{2}$) and supplemented with myo-inositol, vitamin, sucrose, GA₃ and agar was best suited for seeds of *P. nitida* and *P. ledifolia*. In seeds of *A. gynoxoides* the use of the pulp of banana, rather than the GA₃, optimized the germination process. It is considered that with the results of this work, you can provide a contribution to the implementation of strategies for conservation *ex situ* of valuable genetic resources for conservation, reintroduction or promising or ecological restoration for use medicinal or industrial level.

Keywords: *Pentacalia*, *Ageratina*, disinfection, germination.

Introducción

Pentacalia nitida (Kunth) Cuatrec. *Ageratina gynoxoides* (Wedd.) R.M. King & H. Rob y *Pentacalia ledifolia* (Kunth) Cuatrec. (Compositae), hacen parte de la diversidad vegetal nativa de los ecosistemas altoandinos y paramunos colombianos. Poseen potencial de uso para la conservación, reintroducción, restauración ecológica o para el aprovechamiento sostenible a nivel fitoquímico. Éste último aspecto está relacionado directamente con el género *Pentacalia*, del que se ha demostrado la presencia de metabolitos secundarios con importante actividad biológica, específicamente con fines antitumorales y antifúngicos (Santana y Varela, 2013).

Sin embargo, factores como las presiones antrópicas sobre éstos ecosistemas de alta montaña tropical, el escaso conocimiento de los requerimientos de la germinación de semillas de páramo y la baja viabilidad que algunas semillas de las compuestas (*P. ledifolia*) presentan en sus hábitats naturales, han generado la necesidad de implementar acciones de conservación y restauración ecológica, para lo cual el conocimiento básico sobre los rasgos de historia de vida ligados a la semilla se constituye como elemento fundamental en los planes de manejo de áreas con ecosistemas de páramo (Vargas y Pérez-Martínez, 2014).

En este contexto, la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis (JBB), consciente de la importancia de contribuir en la conservación *ex situ* de especies promisorias nativas del bosque altoandino y de páramo, adelanta estudios alrededor de la propagación de compuestas autóctonas, con la aplicación de las técnicas *in vitro*. Es así como se presenta la siguiente investigación, con el objetivo de aportar conocimientos sobre la germinación en condiciones *in vitro*, a través de la evaluación de medios de cultivo suplementados o no con compuestos orgánicos y fitorreguladores. Con la obtención de plantas madre a partir de semilla, se espera aportar una colección de germoplasma base que permita desarrollar un sistema de micropropagación, como una estrategia de conservación *ex situ* de *P. nitida*, *A. gynoxoides* y *P. ledifolia*.

Material y métodos

En el departamento de Cundinamarca (Colombia), se llevó a cabo la colecta de semillas de *P. nitida*, *A. gynoxoides* y *P. ledifolia* en sitios de distribución natural (cuadro 1).

Cuadro 1.
Información geográfica de sitios de colecta de las semillas.

Medios de cultivo	Especie evaluada		
	<i>P. nitida</i>	<i>A. gynoxoides</i>	<i>P. ledifolia</i>
TG1	0.08 ^a	1.60 ^{ab}	NA
TG2	0.00 ^a	1.71 ^a	NA
TG3	0.17 ^a	0.57 ^b	NA
TG4	0.08 ^a	0.71 ^b	NA
TP1	NA	NA	0.00 ^d
TP2	NA	NA	0.50 ^{cd}
TP3	NA	NA	0.17 ^d
TP4	NA	NA	3.50 ^a
TP5	NA	NA	2.00 ^b
TP6	NA	NA	1.33 ^{bc}

El material vegetal fue ingresado al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección Científica del JBB, dónde las semillas fueron recuperadas, limpiadas (retiro del vilano) y almacenadas (en nevera) a 4 °C, hasta el momento de su empleo.

Desinfección de semillas. Las semillas fueron sometidas a un esquema de desinfección superficial realizado en cabina de flujo laminar.

Para *P. nitida* y *A. gynoxoides* el proceso consistió en colocarlas en una solución de twen 20 durante 15 min, hacer enjuagues agua microfiltrada estéril, agregar las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0%; 5.0% 5.5%, 6.0%, 6.5% y 7.0% + dos gotas de twen 20, durante cinco y diez minutos (min.), para un total de 12 tratamientos para *P. nitida* y 10 tratamientos para *A. gynoxoides* (cuadro 2). Finalmente, realizar enjuagues con agua microfiltrada estéril, tomar las semillas con una microespátula estéril y hacer la siembra en el medio de cultivo ½ MS, basado en las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) reducidas en un 50%, enriquecido con (mg l⁻¹): myo-inositol (100), niacina (0.25), piridoxina (0.25), tiamina (0.05), glicina (1), sacarosa (15 000), carbón activado (2 000) y agar (5 000) como agente gelificante.

La unidad experimental estuvo constituida por dos explantes en un frasco de vidrio que contenía 20 ml del medio de cultivo. Para ambas especies se manejaron 10 repeticiones para un total de 440 explantes sembrados. 10 días después de la siembra, se llevó a cabo la evaluación del porcentaje de contaminación por hongos y/o bacterias, obtenido en cada tratamiento de desinfección aplicado.

Para semillas de *P. ledifolia*, el esquema de desinfección se basó en someterlas a una solución jabonosa (jabón neutro) al 2% durante 10 minutos, hacer enjuagues con agua microfiltrada estéril, sumergirlas en NaClO al 4.3% + 1 ml de alcohol al 70%, durante 2 minutos, realizar enjuagues con agua microfiltrada estéril, tomar las semillas con una pinza

estéril y hacer la siembra directamente en los medios de cultivo de germinación.

Cuadro 2

Diseño experimental para la desinfección de semillas de *P. nitida*, *A. gynoxoides*, mediante el empleo de hipoclorito de sodio.

Tiempo (min.)	NaClO (%)	Tratamiento
5	0	T1
	5	T2*
	5.5	T3
	6.0	T4
	6.5	T5
	7.0	T6
10	0	T7
	5	T8*
	5.5	T9
	6.0	T10
	6.5	T11
	7.0	T12

*Tratamientos no aplicados en *A. gynoxoides*

Germinación in vitro de semillas. Una vez evaluada y superada la desinfección de explantes de *P. nitida* y *A. gynoxoides*, se llevó a cabo la siembra en cuatro medios de cultivo basados en el $\frac{1}{2}$ MS sin suplementos (TG1) o suplementado con 30 000 mg l⁻¹ de pulpa de banano (TG2), 200 ml l⁻¹ de agua de coco (TG3) o 0.5 mg l⁻¹ de GA₃ (TG4).

La unidad experimental estuvo constituida por dos explantes en un frasco de vidrio que contenía 20 ml del medio de cultivo. Para *P. nitida*, se sembraron 12 repeticiones por medio de cultivo de germinación. Para *A. gynoxoides*, se manejaron siete repeticiones. En total, fueron sembradas 152 semillas. Semanalmente, durante un mes, se llevó a cabo el registro del porcentaje de germinación. Las semillas de *P. ledifolia*, fueron sembradas en seis medios de cultivo (TP1, TP2, TP3, TP4, TP5 y TP6), cuya composición se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3.

Medios de cultivo evaluados en la germinación *in vitro* de *P. ledifolia*.

Componente (mg l ⁻¹)	TP1	TP2	TP3	TP4	TP5	TP6
Sales MS	50%	50%	50%	50%	50%	50%
Myo-inositol	50	50	50	50	50	50
Niacina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Piridoxina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tiamina	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Glicina	1	1	1	1	1	1
Bencilaminopurina (BAP)	--	2	--	--	--	--
Ácido Indol Acético (AIA)	--	--	2	--	--	--
Ácido giberélico (GA ₃)	--	--	--	2	--	--
Pulpa de banano maduro	--	--	--	--	100 000	50 000
Carbón activado	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
Sacarosa	30 000	30 000	30 000	30 000	30 000	30 000
Agar	6 000	6 000	6 000	6 000	6 000	6 000
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

La unidad experimental estuvo constituida por cuatro explantes en un frasco de vidrio con 20 ml del medio de cultivo. Se manejaron seis repeticiones, para un total de 144 explantes sembrados. El seguimiento del porcentaje de germinación se realizó durante ocho semanas. Para las tres especies, se consideró la semilla germinada cuando hubo emisión de la radícula. Las sales minerales, vitaminas, myo-inositol, AIB, BAP y GA₃, empleados en los diferentes medios de cultivo, fueron de grado analítico.

Sus pesajes se realizaron en una balanza analítica de precisión, su preparación se hizo en agua microfiltrada y fueron añadidos antes de la esterilización en autoclave. Se emplearon recipientes de vidrio con una capacidad de 100 ml para la distribución de 20 ml de medio en cada uno de ellos. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de añadir el agar y la esterilización se realizó en una autoclave a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (15 lb/in²) durante 15 minutos, con una temperatura de vapor aproximada de 121.5 °C.

Los cultivos permanecieron en la sala de incubación del laboratorio, a una temperatura mínima de 24 y máxima de 27 °C, con una humedad relativa del 55% al 70% y con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La intensidad lumínica fue 40 µmol m⁻² s⁻¹, provista por lámparas de luz fluorescente tipo blanco-frío.

Análisis estadístico. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar para cada una de las etapas desarrolladas. Para el análisis de los datos se utilizó la técnica de análisis de varianza "ANOVA" y la prueba de diferencia entre las medias fue calculada empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$), utilizando para ello el programa estadístico SAS® 9.0.

Resultados y discusión

Desinfección de semillas. En las semillas de *P. nitida* y *A. gynoxoides*, los tratamientos de desinfección presentaron diferentes respuestas de contaminación. El tratamiento T8 en *P. nitida* y los tratamientos T4, T6, T10 y T12 en *A. gynoxoides*, presentaron un 0% de contaminación.

Los tratamientos T1 y T7 (testigos) presentaron 100% de contaminación para ambas especies. El análisis de varianza (ANOVA) aplicado para *P. nitida* y *A. gynoxoides*, mostró que al menos uno de los tratamientos influyó de manera positiva sobre la proporción de semillas contaminadas ($P < 0.05$). Se consideró al T4 como el mejor tratamiento de desinfección. Para *P. nitida*, éste tratamiento brindó uno de los promedios de contaminación más bajos unido a una menor exposición de explante al agente desinfectante (en concentración y tiempo de inmersión). Para *A. gynoxoides*, el T4 fue el que proporcionó el menor valor durante la comparación múltiple entre los 12 tratamientos (cuadro 4).

Para semillas de *P. ledifolia*, la contaminación total registrada fue del 19%.

Cuadro 4.Valores promedio de semillas contaminadas de *P. nitida* y *A. gynoxoides*.

Especie	Tratamientos % NaClO/min.											
	T1 0/5	T2 5.0/5	T3 5.5/5	T4 6.0/5	T5 6.5/5	T6 7.0/5	T7 0/10	T8 5.0/10	T9 5.5/10	T10 6.0/10	T11 6.5/10	T12 7.0/10
<i>P. nitida</i>	2.00 a	0.40 c	0.30 c	0.20 c	0.30 c	0.50 bc	2.00 a	0.00 c	0.70 bc	0.40 c	0.60 bc	1.10 b
<i>A. gynoxoides</i>	2.00 a	NA	0.40 bc	0.00c	0.10 c	0.00 c	2.00 a	NA	0.60 b	0.00 c	0.40 bc	0.00 c

* Valores con diferentes letras implica difieren para p<0,05 (Notación Duncan). NA: No Aplicado.

Al emplear semillas como material de partida en el cultivo *in vitro*, se requiere que sean sometidas a un proceso de desinfección superficial para eliminar microorganismos contaminantes que puedan impedir su germinación. Para semillas de *P. nitida* *A. gynoxoides* y *P. ledifolia*, los tratamientos de desinfección estuvieron centrados en el empleo del NaClO como principal agente desinfectante.

Los resultados de desinfección obtenidos concuerdan con el proceso de establecimiento *in vitro* de otras especies pertenecientes al ecosistema altoandino, como *Puya santosii* (L), *Hypericum goyanesii* Cuatrec. e *Hypericum juniperinum* Kunth, para quienes la desinfección de sus semillas se centró en la utilización de éste agente químico (Pedroza-Manrique y Bejarano-Tibocha, 2008; Pérez-Martínez, 2015). Para semillas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (Asteraceae) se alcanzó una desinfección del 99.5% mediante el empleo de una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de cloro activo de 1.5% (Gómez-Serrano *et al.*, 2010).

El NaClO es el agente a base de cloro más empleado y recomendado para la desinfección superficial de materiales a introducir al cultivo *in vitro* (Abdelnour y Muñoz, 2005; Blanco y Valverde, 2004), es útil como bactericida, fungicida, esporicida, virucida y agente oxidante. Presenta las ventajas de muy eficiente para éste propósito, de ser seguro, de ser enjuagado fácilmente y de ser muy económico (Beena *et al.*, 2003; Pedroza-Manrique y Bejarano-Tibocha, 2008). Sin embargo, su empleo en un tiempo prolongado y a elevadas concentraciones, puede alterar las condiciones fisiológicas de los explantes dando lugar a una necrosis y pérdida de la viabilidad (Flores-Escobar *et al.*, 2008).

Germinación in vitro. Para *P. nitida*, el proceso germinativo se inició en la segunda semana después de la siembra, bajo los medios de cultivo TG1 (sin suplemento), TG3 (agua de coco) y TG4 (GA₃). Para esta especie, los medios de cultivo empleados no influyeron significativamente en la variable evaluada ($P= 0.5580$), sin embargo, en la última semana de evaluación, la mayor proporción de semillas germinadas (0.16) se presentó en TG3.

En *A. gynoxoides*, una semana después de la siembra, se observó el inicio de la germinación, en todos los medios de cultivo, excepto en TG3. Al aplicar un análisis de varianza (ANOVA), sobre la proporción de

semillas germinadas al término del tiempo de evaluación, se presentaron diferencias significativas entre los medios de cultivo ($P= 0.0216$). Se destaca el TG2 (pulpa de banano) como el medio de cultivo en el que las semillas de *A. gynoxoides*, alcanzaron el mayor valor de germinación (1.71).

Igualmente para *P. ledifolia*, se observó diferencias entre los medios de cultivo sobre el resultado de los valores de la mencionada variable ($P < 0.05$). Con el medio de cultivo TP4 (GA₃), la proporción de semillas germinadas correspondió a 3.50, siendo éste el valor más alto y significativamente diferente a los demás medios de cultivo ensayados para *P. ledifolia* (cuadro 5).

Los porcentajes de germinación acumulada para los diferentes medios de cultivo, de acuerdo a la especie evaluada, se presentan en la figura 1.

Cuadro 5

Valores promedio de semillas germinadas de *P. nitida*, *A. gynoxoides* y *P. ledifolia*.

Medios de cultivo	Especie evaluada		
	<i>P. nitida</i>	<i>A. gynoxoides</i>	<i>P. ledifolia</i>
TG1	0.08 ^a	1.60 ^{ab}	NA
TG2	0.00 ^a	1.71 ^a	NA
TG3	0.17 ^a	0.57 ^b	NA
TG4	0.08 ^a	0.71 ^b	NA
TP1	NA	NA	0.00 ^d
TP2	NA	NA	0.50 ^{cd}
TP3	NA	NA	0.17 ^d
TP4	NA	NA	3.50 ^a
TP5	NA	NA	2.00 ^b
TP6	NA	NA	1.33 ^{bc}

*Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p<0.05$ (Notación Duncan). NA: No Aplicado.

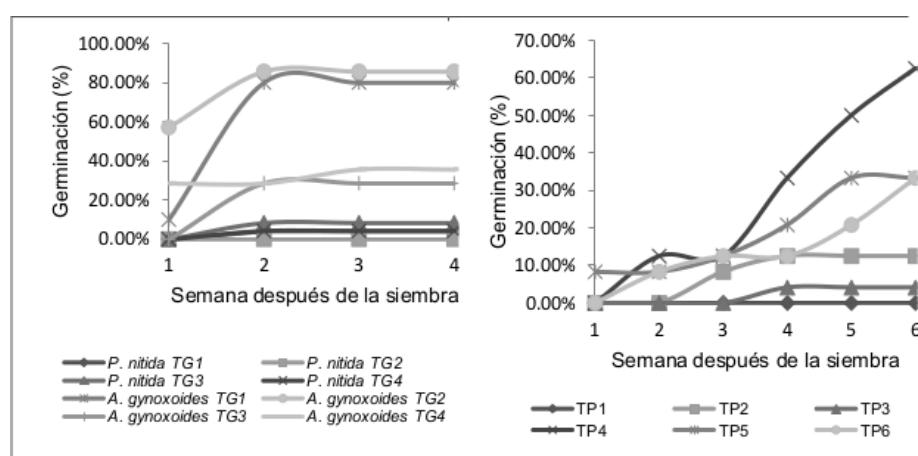


Figura 1
Porcentajes (%) de germinación acumulada de los diferentes medios de cultivo para *P. nitida* y *A. gynoxoides* (A) y *P. ledifolia* (B). Barra: error típico.

Para *P. nitida* y *P. ledifolia*, se hizo necesaria la adición al medio de cultivo del fitorregulador GA₃ para la obtención de la mayor proporción de semillas germinadas. Esto evidencia que el rompimiento de la latencia se vio favorecido por la adición al medio de cultivo de citoquininas, giberelinas o fluridone, tal y como proponen Ali-Ra-chedi *et al.* (2004). Específicamente, las giberelinas han sido directamente implicadas en el control y la promoción de la germinación en diferentes especies (Arteca, 1996 citada en Araya *et al.* 2010).

Para *A. gynoxoides*, el empleo de la pulpa de banano optimizó el proceso germinativo. Éste tipo de compuesto orgánico, al tener altas concentraciones de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento (Arditti, 1993), ha favorecido procesos germinativos *in vitro* de diferentes especies principalmente pertenecientes a la familia Orchidaceae.

Flores-Escobar *et al.* (2011), Moreno y Menchaca (2007) y Kaur y Buthani (2012), consideran que con el empleo de suplementos orgánicos, en lugar de fitorreguladores, se obtienen varios beneficios en la propagación *in vitro* de orquídeas, relacionados con el mejoramiento de las tasas de germinación y crecimiento de orquídeas y con la reducción de los costos de producción.

Es oportuno referir que además del medio de cultivo, existen otros factores que no fueron evaluados en la presente investigación y que pueden influir en la germinación de asteráceas y se relacionan con la aplicación de tratamientos pregerminativos, la determinación de la madurez de las semillas y el efecto de la luz en condiciones de incubación. Los estudios de fuentes de material vegetal (semilleras) para garantizar la colecta de explantes en los momentos adecuados de viabilidad (Vargas y Pérez-Martínez, 2014), se consideran otro factor importante que podría incidir en la germinación *in vitro*.

En especies forestales, como *Quillaja saponaria* Mol., la germinación *in vitro*, el crecimiento de las plántulas y el enraizamiento se encuentran estrechamente relacionados con el origen materno de las semillas (Prehn *et al.*, 2003). Es así como el conjunto de estos factores podría tener una incidencia particular en el proceso de germinación de cada especie vegetal.

Conclusiones

La desinfección y el establecimiento *in vitro* de explantes se convierte, en ciertas ocasiones, en un problema cuando no hay disponibilidad de material vegetativo o cuando se dispone de él pero con un alto grado de contaminación al ser colectado en condiciones naturales. Por lo anterior, el uso de semillas de *P. nitida*, *A. gynoxoides* y *P. ledifolia* como material de partida, fue una buena alternativa para lograr el establecimiento aséptico de explantes, mediante el empleo del NaClO como principal agente desinfectante.

La germinación *in vitro* de las especies de compuestas estudiadas, está influenciada por la adición de suplementos orgánicos (pulpa de banano) o fitorreguladores (GA₃) al medio de cultivo MS reducido en un 50% en

sus sales inorgánicas ($\frac{1}{2}$ MS), siendo 8.3%, 85.7% y 83.3% los máximos porcentajes de germinación alcanzados para *P. nitida*, *A. gynoxoides* y *P. ledifolia*, respectivamente.

La metodología y resultados de la fase de establecimiento *in vitro* desarrollada para *P. nitida*, *A. gynoxoides* y *P. ledifolia*, especies autóctonas y silvestres, brinda un aporte para el conocimiento del comportamiento *in vitro* de compuestas altoandinas y paramunas colombianas, para las cuales existen escasos trabajo de propagación publicados.

Literatura citada

- ABDELNOUR, A. y MUÑOZ, A. 2005. Micropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5):1-11.
- ALI-RACHEDI, S.; BOUINOT, D.; WAGNER, M.; BONNET, M.; SOTTA, B.; GRAPPIN, P. and JULLIEN, M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. Plant 219:479-488.
- ARAYA, E.; GÓMEZ, L.; HIDALGO, N. y VALVERDE, R. 2010. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaul (*Alnus acuminata*). Agronomía Costarricense 24(1):75-80.
- ARDITTI, J. and ERNST, R. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York p. 1-23.
- BEENA, M.R.; MARTIN, K.P.; KIRTI, P.B. and HARIHANAN, M. 2003. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72:285-289.
- BLANCO, M. y VALVERDE, R. 2004. Micropagación de *Philodendron* sp. Agronomía Costarricense. 28(1):39-46.
- FLORES-ESCOBAR, G.; LEGARIA-SOLANO, J.; GIL-VÁSQUEZ, I. y COLINAS-LEÓN, M. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(3): 347-353.
- FLORES-ESCOBAR, G.; GIL-VÁSQUEZ, I.; COLINAS-LEÓN, M. y MATA-ROSAS, M. 2011. Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(1):5-8.
- GÓMEZ-SERRANO, G.; CRISTIANI-URBINA, E. y VILLEGRAS-GARRIDO, T. 2010. Establecimiento de protocolos para la propagación *in vitro* de plantas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (compositae) colectadas en la sierra de Guadalupe. Polibotánica 30:89-110.
- KAUR, S. y BHUTANI, K. 2012. Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. Hort. Sci. (Prague) 39(1):47-52.
- MORENO, D. y MENCHACA, R. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (orchidaceae). Foresta Veracruzana 9(2):27-32.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.

- PEDROZA-MANRIQUE, J.A. y BEJARANO-TIBOCHA, A. 2008. Propagación vegetativa *in vitro* de *Puya santossii*. Rev. Colomb. Biotecnol. 10(1):36-48.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, B.A. 2015. Establecimiento *in vitro* de *Hypericum goyanesii* Cuatrec. e *Hypericum juniperinum* Kunth, a partir del cultivo de semillas. Rev. Colomb. Biotecnol. 17(2):156-160. doi: 0.15446/rev.colomb.biote.v17n2. 54294.
- PREHN, D.; SERRANO, C.; BERRIOS, C. y ARCEJOHNSON, P. 2003. Micropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. Bosque 24(2):3-12.
- SANTANA, I. y VARELA, D. 2013. Estudio químico de la especie colombiana *Pentacalia abietina* como nueva fuente natural de compuestos tipo kaurano y quinol. Revista de la facultad de Ingeniería Ontare 1(1):81-99.
- VARGAS, O. y PÉREZ-MARTÍNEZ, L.V. 2014. (Eds.). Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Grupo de Restauración Ecológica. Universidad Nacional de Colombia. 176 p.