



Revista de la Facultad de Agronomía

ISSN: 1669-9513

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Universidad Nacional de La Plata

Argentina

Dalzotto, Daniela; Espíndola, Micaela; Zubillaga, Fany; Piñuel, Lucrecia; Boeri, Patricia

Propagación y conservación de "monte negro" (*Bougainvillea spinosa* (cav.) heimerl.) a través del cultivo de tejidos vegetales

Revista de la Facultad de Agronomía, vol. 121, Esp., 2022, Octubre-Diciembre

Universidad Nacional de La Plata

Argentina

- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org



Propagación y conservación de “monte negro” (*Bougainvillea spinosa* (cav.) heimerl.) a través del cultivo de tejidos vegetales

Propagation and conservation of "monte negro" (*Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl.) by plant tissue culture

Daniela Dalzotto*

Universidad Nacional de Río Negro-Sede Atlántica-departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería, Viedma, Río Negro, Argentina
Centro de Investigación y Transferencia CIT-CONICET-UNRN, Argentina

Micaela Espíndola

Universidad Nacional de Río Negro-Sede Atlántica-departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería, Viedma, Río Negro, Argentina, Argentina

Fany Zubillaga

Universidad Nacional de Río Negro-Sede Atlántica-departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería, Viedma, Río Negro, Argentina
Centro de Investigación y Transferencia CIT-CONICET-UNRN, Argentina

Lucrecia Piñuel

Universidad Nacional de Río Negro-Sede Atlántica-departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería, Viedma, Río Negro, Argentina
Centro de Investigación y Transferencia CIT-CONICET-UNRN, Argentina

Patricia Boeri

Universidad Nacional de Río Negro-Sede Atlántica-departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería, Viedma, Río Negro, Argentina
Centro de Investigación y Transferencia CIT-CONICET-UNRN, Argentina

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

Vol. 121 (Num. Esp. 2), 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recivido: 26/07/2022

Aceptado: 08/09/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546010/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e096>

***Autor de Correspondencia:** dcdalzotto@unrn.edu.ar

Resumen

Actualmente, se ha identificado la necesidad de emprender acciones que faciliten la conservación de la biodiversidad y la recuperación de áreas degradadas, al mismo tiempo que se promueva el desarrollo sostenible. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV), permite producir un gran número de individuos, en tiempo y espacios reducidos. A través de la técnica de semillas sintéticas (SS), el CTV posibilita la propagación y conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. El monte negro (*Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl.), es una especie del monte, nativa de Argentina. El objetivo de este trabajo fue evaluar la propagación de *B. spinosa* a través del CTV, para contribuir a su conservación y uso sustentable. Se estudió la germinación *in vitro* de las semillas, la expresión morfogénica de explantes juveniles y el almacenamiento de SS de esta especie. Se alcanzó una germinación de 98,67% y los parámetros germinativos evaluados fueron comparables a los de otras especies (Energía germinativa:61,33%; tiempo medio de germinación:1,79 días; índice de vigor:76,80). La formación de callo fue la respuesta morfogénica más frecuente, aún en medios libres de reguladores de crecimiento y sólo se logró un 10% de enraizamiento en medios suplementado con IBA 5mg/l. Por otra parte, se logró la conversión de las SS luego del almacenamiento en frío (13,33%). Se obtuvo, por primera vez, una metodología de germinación *in vitro* eficiente, que permitió establecer los primeros avances en CTV y en la aplicación de SS de *B. spinosa* para el desarrollo de nuevos protocolos de propagación y conservación *ex situ* de la especie.

Palabras clave: micropropagación, semillas sintéticas, flora nativa

Abstract

Currently, the need to undertake actions that facilitate the conservation of biodiversity and the recovery of degraded areas, while promoting sustainable development, has been identified. *In vitro* plant tissue culture (CTV) allows the production of a large number of individuals, in reduced time and space. In addition, through the synthetic seed technique (SS), the CTV enables the propagation and *ex situ* conservation of plant genetic resources. The monte negro (*Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl.) is a Monte species, native to Argentina. The objective of this work was to evaluate the propagation of *B. spinosa* through the CTV, to contribute to its conservation and sustainable use. *In vitro* germination of the seeds, morphogenic expression of juvenile explants and storage of SS of this species were studied. A germination of 98.67% was reached and the evaluated germinative parameters were comparable to those of other species (Germination energy:61.33%; mean germination time:1.79 days; germination vigor index:76.80). Callus formation was the most frequent morphogenic response, even in free of growth regulators media, and only 10% rooting was achieved in media supplemented with IBA (5mg/l). On the other hand, the conversion of SS was achieved after cold storage (13.33%). Thus, an efficient *in vitro* germination methodology was obtained for the first time, which made it possible to establish the first advances in CTV and in the application of synthetic seeds of *B. spinosa* for the development of new protocols for propagation and *ex situ* conservation of the species.

Keywords: micropropagation, synthetic seeds, native flora

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha señalado la imperiosa necesidad de tomar medidas para conservar y usar de forma sostenible la diversidad biológica a nivel mundial (CDB, 1992; IPBES, 2019). De este modo, resulta necesario emprender acciones que faciliten la conservación de la biodiversidad y la recuperación de áreas degradadas, al mismo tiempo que se promueva el desarrollo sostenible, especialmente en ambientes vulnerables, como las zonas áridas y semiáridas de la Patagonia. En este sentido, la biotecnología, y especialmente las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (CTV) o de micropropagación, son utilizadas para la producción de un gran número de individuos, en espacios reducidos y en cortos periodos de tiempo. Además, el CTV permite la aplicación de técnicas como la producción de semillas sintéticas para la propagación y conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos que, en muchos casos, no podrían ser conservados mediante técnicas convencionales (Cano Castillo, 2013). La aplicación de estas biotécnicas permite tanto la preservación de material genéticamente homogéneo (clones), como de la variabilidad genética presente en una región o centro de origen (Sharry et al., 2015). De esta manera, el cultivo de tejidos ha sido ampliamente utilizado en diferentes programas de conservación y propagación de muchas especies nativas (Verdes, 2007; Estomba et al., 2010; Cordal et al., 2014).

Por otra parte, las técnicas de CTV presentan la posibilidad de producir metabolitos secundarios a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Estos compuestos metabólicos, además de cumplir un rol ecológico fundamental en los procesos de adaptación y supervivencia de las plantas, suelen ser de importancia comercial para la industria farmacéutica, alimentaria, de cosméticos, y como fuentes de numerosas sustancias de importancia agroquímica (Karuppusamy, 2009).

Bougainvillea spinosa, conocida como “monte negro”, es una especie del monte, nativa de Perú, Bolivia, Paraguay y Argentina. Pertenecer a la Familia *Nyctaginaceae* (Orden Centrospermales) y se caracteriza por presentar una flor solitaria, central, con tres brácteas, lo que la ubica como única representante de la sección Trycicla. Es un arbusto ramificado de 1-3 metros de altura con espinas rígidas típicamente bifurcadas. Es conocido que más del 90% de los arbustos de las zonas áridas tienen algún tipo de latencia en las semillas (Baskin y Baskin, 2014). Sin embargo, los estudios sobre germinación de este género se han llevado a cabo mayoritariamente en especies tropicales y aún es limitada esta información en las *Bougainvillea spp* de ecosistemas desérticos (Chaparro et al., 2005; Beider, 2012; Baskin y Baskin, 2014; Rodríguez Araujo, 2021).

Por otro lado, el género presenta cierto interés debido a su potencial farmacéutico/medicinal, como es el caso de *Bougainvillea glabra*, especie de reconocido uso ancestral en el tratamiento de afecciones gástricas, en la que se ha determinado propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (Saleem et al., 2021). Si bien existen antecedentes del cultivo *in vitro* en otras especies de *Bougainvillea spp* (Ahmad et al., 2007; Anand et al., 2016; Kumari et al., 2016), aún no se han establecido metodologías eficientes de conservación y propagación de *B. spinosa* (Abarca -Vargas y Petricevich, 2018).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de *B. spinosa* al cultivo de tejidos *in vitro* y a la producción de semillas sintéticas como una alternativa de propagación, conservación y uso sustentable de la especie.

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS

La colecta se realizó en la localidad de Carmen de Patagones, partido de Patagones, provincia de Buenos Aires (40°48'40"S; 62°58'08"O). Se seleccionaron un total de 10 plantas madres de buen porte, aspecto vigoroso y óptimo estado sanitario. La colecta de los frutos se realizó entre los meses de noviembre y octubre de 2018 y 2019. Luego, se removieron las brácteas en forma manual y se seleccionaron aquellas semillas de mejor aspecto (voluminosas y de color verde-amarillento).

DESINFECCIÓN DE LAS SEMILLAS

La desinfección se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Espíndola (2021). Primeramente, las semillas fueron sumergidas en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (30%, 4 min), a continuación, se realizó una inmersión en etanol (70%, 5 min) y luego en una solución de hipoclorito de sodio (20%, 10 min). Finalmente, las semillas se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril.

EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN IN VITRO: PARÁMETROS GERMINATIVOS Y CINÉTICA DE LA IMBIBICIÓN

Las semillas fueron dispuestas bajo condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) en placas de petri en medio basal de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad de su concentración (½MS) adicionado con 20 g/l de sacarosa. Se realizaron tres repeticiones de 25 semillas cada una (N=75). Luego, se incubaron en un cuarto de cultivo con condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y 21±2° C). Se realizó un recuento diario de las semillas germinadas durante un periodo de 2 semanas. En este trabajo se consideró como semilla germinada a aquella que presentaba la radícula visible (>1mm longitud). Finalmente, se evaluaron los siguientes parámetros germinativos:

- Capacidad Germinativa (CG): porcentaje de germinación total al finalizar el ensayo (Pece et al., 2010).
- Energía Germinativa (EG): porcentaje de germinación acumulada diaria cuando la tasa de germinación fue la más alta (González et al., 2008).
- Tiempo Medio de Germinación (TMG): número promedio de días utilizados en la germinación calculado a través de la siguiente ecuación (Bewley y Black, 1994; Rodríguez Araujo, 2021).

$$TMG = \frac{\sum D * n_i}{nt}$$

Donde D: es el número de días registrados desde el comienzo de la germinación, n: es el número de semillas germinadas en el día D y nt: número total de semillas germinadas.

- Índice de Vigor Germinativo (IVG): tiempo necesario para que se lleve a cabo la germinación de todas las semillas viables (Jain y Saha, 1971). Los valores de este parámetro, que también cuantifica la velocidad de la germinación, pueden oscilar entre 1-100.

$$IVG = (a/1 + b/2 + c/3 + \dots + z/n) \times 100/s$$

Donde a,b,c...z: es el número de semillas germinadas en el día 1,2,3...n; n: es el número total de días que dura el ensayo; s: número total de semillas sembradas. Los valores obtenidos fueron comparados con los propuestos por Bradbeer (1988);

IV < 5: velocidad de germinación *lenta*.
 5 ≤ IV ≤ 11,11: velocidad de germinación *mediana*.
 11,11 ≤ IV ≤ 33,33: velocidad de germinación *ligera*.
 IV > 33,33: velocidad de germinación *rápida*.

- Germinación diaria acumulada (GDA), calculada según lo propuesto por Trujillo (1996).
 $GDA = n * 100 / Nt$

Donde n= es el número de semillas germinadas por día y Nt: número total de semillas.

CURVA DE IMBIBICIÓN

La permeabilidad de las semillas está íntimamente influenciada por las características del tegumento seminal (Méndez-Natera et al., 2008), por este motivo se evaluó la cinética de imbibición de las semillas desprovistas de brácteas. Para ello, se registró el peso seco inicial (W_i) de 10 semillas de *B. spinosa* y luego de la inmersión en agua destilada (W_d), durante intervalos de tiempo creciente. El primer registro fue a los 20 minutos del inicio de la imbibición, y luego se pesaron cada 30 minutos, hasta alcanzar un peso constante. En cada periodo de imbibición, las semillas fueron mantenidas en oscuridad, a 25°C. El aumento en masa de las semillas fue calculado según Baskin et al. (2004):

$$\% \text{ incremento en masa} = [(W_i - W_d) / W_d] \times 100.$$

Donde, W_i y W_d = masas de semillas imbibidas y secas, respectivamente.

MULTIPLICACIÓN DE *B. SPINOSA* IN VITRO: INDUCCIÓN A LA ORGANOGÉNESIS (CAULOGÉNESIS, CALLOGÉNESIS Y RIZOGÉNESIS)

Para este ensayo se utilizaron como explantes segmentos nodales de aproximadamente 1,5 cm de alto, provenientes de vitroplantas. Los mismos fueron cultivados en ½ MS suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento tal como se detalla en la Tabla 1. Cada tratamiento estuvo representado por 3 réplicas con 10 explantes cada uno ($N=30$) los cuales fueron incubados bajo condiciones de luz y temperatura controladas (16 hs luz/8hs oscuridad; $21 \pm 2^\circ\text{C}$).

Las respuestas organogénicas evaluadas fueron: obtención de explantes con brotes; número de brotes por explante; presencia de callo y obtención de raíces.

SEMILLAS SINTÉTICAS

Para la obtención de semillas sintéticas (SS) se encapsuló, bajo campana de flujo laminar secciones nodales de vitroplantas. Los explantes fueron sumergidos en una matriz de alginato de sodio al 2% (p/v) y recogidos en pequeñas gotas, que posteriormente se dispusieron en una solución de cloruro de calcio (100 mM), con un tiempo de inmersión de entre 30-60 segundos. Cada tratamiento estuvo representado por 3 réplicas de 10 explantes cada uno ($N:30$). Las SS obtenidas fueron cultivadas directamente en ½ MS (t_0) y almacenadas en frío (4°C) y en oscuridad durante una y dos semanas (t_1 y t_2 , respectivamente). Finalizado este periodo, las mismas fueron cultivadas bajo condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 hs luz/8hs oscuridad y $21 \pm 2^\circ\text{C}$). Transcurridas 6 semanas de ensayo se registró el porcentaje de conversión de las SS (Ray y Bhattacharya, 2008). Asimismo, se registró el porcentaje de SS que presentaron callos y/u oxidación.

Tabla 1

Caracterización de los medios de cultivo empleados en los diferentes tratamientos de organogénesis evaluados tratamientos para organogénesis y medios de cultivo empleados. MS: Murashige y Skoog, PGR: reguladores de crecimiento, BAP: bencilaminopurina, AG_3 : ácido giberélico, IBA: ácido indolbutírico.

Tratamientos	Medio nutritivo, reguladores de crecimiento y concentración
Control (t_0)	½ MS sin reguladores de crecimiento (PGR)
t_1	½ MS BAP (3,0 mg/l)+ AG_3 (0,01 mg/l)
t_2	½ MS IBA (2,5 mg/l)
t_3	½ MS IBA (5,0 mg/l)

DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS

Los ensayos de este trabajo presentaron un diseño completamente al azar. Las repeticiones y el número de muestras fueron ajustadas de acuerdo al tipo de explante y metodología utilizada. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el uso del test no paramétrico de Kruskal-Wallis, mediante el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN EN CONDICIONES IN VITRO: PARÁMETROS GERMINATIVOS Y CINÉTICA DE LA IMBIBICIÓN

En relación al porcentaje de semillas germinadas, el uso de H_2O_2 durante el proceso de desinfección y el tiempo de inmersión establecido permitió obtener una CG del 98,67% y una EG de 61,33% tal como se observa en la Figura 1. Por otra parte, se determinó un TMG de 1,79 y un IV de 76,80 para las semillas *B. spinosa*.

Por otra parte, en la Figura 2 se muestra la cinética de imbibición de las semillas de *B. spinosa*, donde se observó un constante incremento de masa en función del tiempo. En este sentido, la hidratación fue relativamente rápida, después de 1 h de inmersión, se logró un incremento próximo al 100% de su peso inicial, mientras que se alcanzó el grado de saturación a las 4,5 h donde el peso de la semilla se incrementó un 200%.

MULTIPLICACIÓN DE *B. SPINOSA* IN VITRO: ORGANOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN Y PROLIFERACIÓN DE BROTES

Del análisis de las respuestas morfogénicas observadas en el cultivo *in vitro* de *B. spinosa* surge que, a pesar de la adición de diferentes reguladores de crecimiento (t1: BAP 3 mg/l+AG₃ 0,01 mg/l; t2: IBA 2,5 mg/l), los explantes presentaron una tendencia a producir brotes adventicios, aún en ausencia de PGR (t0) (Tabla 2). Así, en el tratamiento t1, se obtuvo un incremento tanto en el número de brotes/explante, como de explantes con brotes.

Los brotes obtenidos en t1 presentaron un aspecto vítreo y transparente, con tallos de mayor diámetro, entrenudos cortos, hojas hinchadas, turgentes y frágiles, características propias de la hiperhidricidad (Sharry et al., 2015). Este fenómeno, está relacionado con desórdenes fisiológicos como la pérdida de dominancia apical y el desarrollo de callo en la base del tallo (Cassells y Curry, 2001). Por el contrario, en los tratamientos t0 y t2 no se observó hiperhidricidad y, en este último caso, los brotes presentaron mayor elongación respecto a t0 y t1.

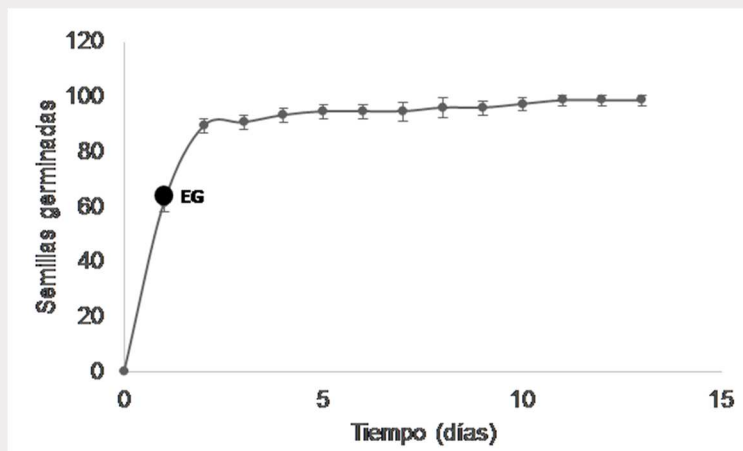


Figura 1

Porcentaje de germinación diaria acumulada en función del tiempo.

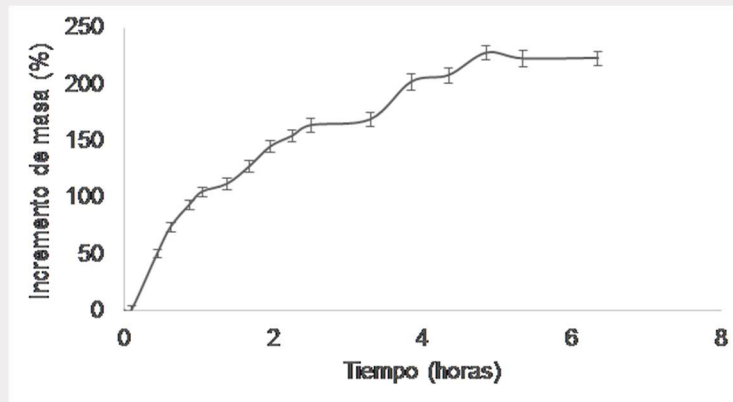


Figura 2

Curva de imbibición de las semillas estudiadas.

Tabla 2

Porcentaje de explantes de *B. spinosa* con brotes y número de brotes por explante para los tratamientos evaluados, donde t0: ½ MS sin PGR, t1: ½ MS BAP (3,0 mg/l)+AG3 (0,01 mg/l), t2: ½ MS IBA (2,5 mg/l), t3: ½ MS IBA (5,0 mg/l). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Cada resultado se expresa con su Error Estándar.

Tratamiento	Explantes con brotes (%)	Número brotes por explante
Control (t0)	23 ± 10 ^{ab}	1 ± 0,6 ^a
t1	90 ± 10 ^a	3,5 ± 0,9 ^b
t2	7 ± 2 ^b	0,3 ± 0,5 ^a
t3	0 ^c	0 ^c
p-valor	0,0071	< 0,0001

CALLOGÉNESIS

Si bien un balance $A/C \approx 1$ induce la callogénesis, la presencia de callos aún en medios de inducción de brotes, permitió evaluar esta respuesta morfogénica (t1). En todos los casos se observó la formación de callo en la base del explante, sin embargo, dada la variabilidad observada, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos (Tabla 3).

Respecto a las características morfológicas de los callos obtenidos en los diferentes tratamientos, se pueden mencionar que todos presentaron una textura friable; aspecto vítreo a verde (sin oxidación) y, en menor medida, se evidenciaron algunos callos fenólicos (amarronados, con oxidación). Además, se observaron diferencias respecto al tamaño alcanzado de los callos en los medios suplementados con PGR, los cuales, presentaron aproximadamente el doble de tamaño ($3 \pm 0,5$ cm) que aquellos obtenidos en t0 ($0,5 \text{ cm} \pm 0,4$), transcurrido el mismo periodo de tiempo.

RIZOGÉNESIS

En relación a la formación de raíces, nuestros resultados indican que, la adición de IBA (5 mg/l) al medio de cultivo (t3) permitió obtener un 10% de explantes con raíces. Estos resultados podrían estar relacionados a la presencia de auxinas, las cuales promueven la rizogénesis. El análisis estadístico demostró que no se existen diferencias significativas ($p>0,05$) entre los tratamientos t0 (sin PGR) y t2 (IBA 2,5 mg/l), ambos sin formación de raíces.

SEMILLAS SINTÉTICAS

La viabilidad y conversión de los tejidos meristemáticos encapsulados depende en gran medida de factores como la luz, la temperatura y el periodo de almacenamiento. Como se aprecia en la Figura 3, la incubación de las semillas sintéticas (SS) en condiciones controladas de luz (fotoperiodo) y temperatura (t0) produjo un porcentaje de conversión similar (10%) al de aquellas que fueron previamente almacenadas a 4°C, durante 1 (t1) y 2 semanas (t2) (13,33%, en ambos tratamientos). Además, los brotes obtenidos bajo esas condiciones no presentaron los síntomas de etiolación (pérdida de color, tallos delgados y débiles) observados en otras *Nictaginaceae* (Ray y Bhattacharya, 2008). La conversión de las SS de *B. spinosa* se inició con la activación de los brotes o yemas axilares de los explantes nodales y posterior ruptura de la matriz de encapsulamiento.

Luego de 6 semanas de incubación en condiciones *in vitro* se observaron eventos de oxidación. Tanto en t1 como t2, el porcentaje de oxidación aumentó conforme transcurrió el tiempo de ensayo (83,33% y 73,33% respectivamente). Por otra parte, durante las primeras dos semanas, t0 no presentó oxidación y luego mostró la misma tendencia que los demás tratamientos, hasta alcanzar valores del 87% (Figura N° 4).

Tabla 3

Porcentaje de explantes con callos donde t0 ½ MS sin PGR, t1: ½ MS+BAP (3mg/l)+AG3 (0,01 mg/l); t2: ½ MS IBA (2,5 mg/l), t3: ½ MS IBA (5 mg).

t0	t1	t2	t3
56,67%±25,17	96,67%±5,77	96,67%±5,77	90,00%±14,14

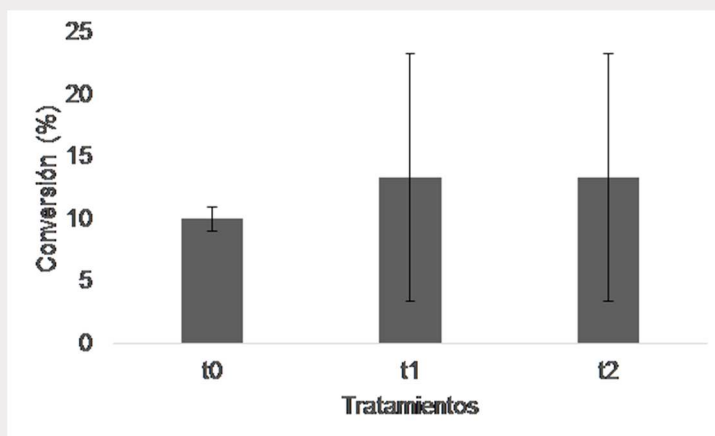


Figura 3

Porcentaje de conversión de las semillas sintéticas por tratamiento. t0: cultivadas directamente en ½ MS sin almacenamiento previo t1: cultivadas en ½ MS luego de una semana de almacenamiento (4°C) t2: cultivadas en ½ MS luego de dos semanas de almacenamiento (4°C).

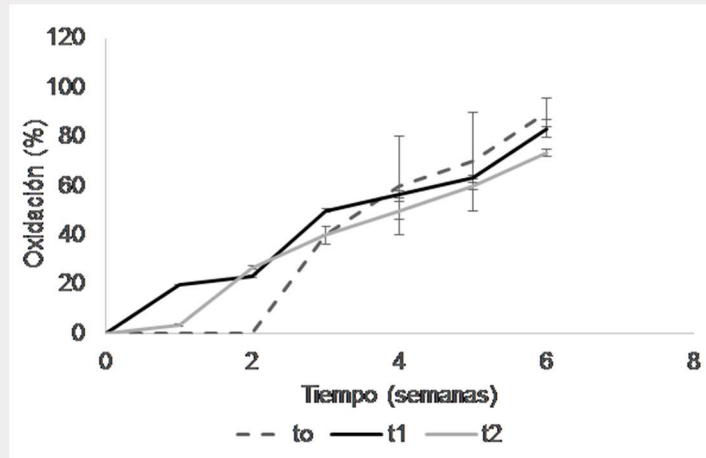


Figura 4

Valores porcentuales de oxidación en función del tiempo para cada uno de los tratamientos evaluados.

Otras respuestas morfogénicas fueron evidenciadas durante el período de incubación de las SS. En aquellas correspondientes al t0 y al t2 se observó la ruptura de la matriz de alginato y la emergencia de los explantes por elongación de los mismos, sin que éstos produjeran nuevas hojas (20% y 3,33%, respectivamente). Por otro lado, en todos los tratamientos se obtuvieron explantes con callos en la zona de corte del explante encapsulado, algunos de los cuales aumentaron su tamaño hasta, incluso, emerger de las cápsulas. Los resultados obtenidos a partir del encapsulamiento de secciones nodales indican que es posible establecer un procedimiento de conservación para *B. spinosa*, durante dos semanas, a 4°C, sin que éstos pierdan la viabilidad y capacidad de conversión

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, la energía germinativa fue superior (60%) a las informadas para otras *Nyctaginaceae*, durante el primer día de ensayo. En este sentido, Ferrando Pardo et al. (2008) informaron una EG de 17% al cuarto día para semillas de *Boerhavia repens* L. subsp. *repens*, incubadas en condiciones similares de luz y temperatura. Asimismo, la capacidad germinativa (CG) registrada en este trabajo (98,68%) se obtuvo durante la segunda semana desde el inicio del ensayo, mientras que en *B. repens*, la máxima CG se alcanzó en la cuarta semana, y con un valor inferior al aquí obtenido (41%). De la comparación del Índice de Vigor (IVG) y los valores establecidos por Bradbeer (1988) se determinó que *B. spinosa*, presenta una velocidad de germinación rápida ($IVG > 33,33$), mientras que el IVG de *B. repens* se corresponde con una velocidad de germinación ligera ($IVG: 11,11 \leq 33,33$).

Dado que *B. spinosa* tiene la característica de dispersar sus semillas dentro del perigonio, que conserva además sus tres brácteas membranosas, diferentes autores evaluaron el efecto de estas estructuras maternas sobre la germinación. En este sentido, Chaparro et al. (2005) observaron que las brácteas ejercen un efecto inhibitorio con un valor máximo de germinación de 80%, en ausencia de las mismas. Por otra parte, Rodríguez Araujo (2021), reportó altos porcentajes de germinación (94-100%), tanto en semillas control como en aquellas que recibieron pre-tratamientos de escarificación química (durante 5 minutos) y frío-húmedo (durante 7 y 30 días). Los porcentajes de germinación informados por estos autores para las semillas de *B. spinosa* (sin estructuras maternas) son comparables con los obtenidos en el presente estudio, donde además se obtuvo un TMG menor (1,79 días) que aquellos informados por Rodríguez Araujo (2021), tanto en el control como en los tratamientos. Si bien Baskin y Baskin (1998) reportaron que la latencia física y fisiológica son las estrategias más frecuentes en arbustos de regiones áridas, en este estudio se pudo observar que las semillas de *B. spinosa* desprovistas de brácteas, alcanzaron rápidamente una CG elevada y un IVG alto. Además, la EG obtenida también fue superior respecto de lo informado para

otras especies de la familia *Nyctaginaceae*. Así, los valores de estos parámetros indican que las semillas de *B. spinosa* desprovistas de estructuras maternas no presentan mecanismos de latencia. Esto fue además confirmado por la cinética observada en la curva de imbibición de las semillas, la cual demostró que el proceso germinativo se inició inmediatamente junto con la absorción de agua (primera etapa del proceso de germinación). Así, los parámetros germinativos obtenidos, junto con los informados para esta especie por Chaparro et al. (2005), Beider (2012) y Rodríguez Araujo (2021) refuerzan la idea de falta de latencia en las semillas de *B. spinosa*, cuando éstas son despojadas de las estructuras maternas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los mecanismos de latencia representan una ventaja adaptativa en ambientes hostiles, como los del noreste patagónico. Así, la falta de ésta podría vincularse con el fenómeno de vecería, es decir, la variación cíclica en la producción de frutos/semillas en los distintos años, que ha sido observada en esta especie. Este fenómeno se produce frecuentemente en muchas especies nativas, especialmente en aquellas que habitan ambientes con marcada amplitud térmica, en las cuales se ha observado diferencias en las tasas de producción de frutos/semillas e incluso en la viabilidad, en un mismo año (Varela y Aparicio, 2011; Karlin y Accietto, 2014). Por otra parte, los resultados de nuestro trabajo indican que las condiciones óptimas propias del cultivo *in vitro* favorecieron los procesos germinativos. De esta manera, este estudio constituye la primera evaluación de la germinación de *B. spinosa* bajo condiciones de cultivo de tejidos vegetales.

A partir de estudios preliminares en el cultivo *in vitro* de esta especie, se observó que la adición de IBA en los medios nutritivos podría estar asociada a la obtención de brotes adventicios (datos no informados). Por ello, se evaluó la inducción de brotes en medios de cultivo suplementados con diferentes reguladores de crecimiento, entre los cuales se incluyó la adición de esta auxina (IBA).

En relación a la inducción y proliferación de brotes, a pesar de la adición de diferentes reguladores de crecimiento (t1: BAP 3 mg/l+AG₃ 0,01 mg/l; t2: IBA 2,5 mg/l), los explantes tendieron a producir brotes adventicios, aún en ausencia de éstos (t0). Esta respuesta ha sido previamente informada en otras especies leñosas de ambientes xerofíticos y podría estar relacionada con mayores concentraciones endógenas de hormonas ante las condiciones de estrés donde estas plantas crecen (Boeri et al., 2019). Estas condiciones favorecen la síntesis de metabolitos secundarios, especialmente aquellos que median las respuestas de las plantas frente a situaciones estrés, como el ácido abscísico (ABA) y las citocininas (como el BAP) (Wani et al., 2016). De esta manera, el aumento significativo en la producción de brotes observada en t1, podría deberse a que los niveles totales de citocininas aumentaron producto del efecto conjunto del BAP adicionado al medio y aquellas citocininas propias del tejido/explante, en concordancia con el modelo de Skoog y Miller (1957). Es modelo indica que cuando la relación auxina/citocinina es alta ($A/C > 1$) se induzca la formación de raíces (rizogénesis), cuando es baja ($A/C < 1$) se produzcan vástagos (caulogénesis) y con relaciones cercanas a 1 ($A/C \approx 1$) se obtengan callos. En este sentido, la adición de auxinas (t2) podría contrarrestar el efecto de las citocininas endógenas y provocar así una disminución en la producción de brotes, aún por debajo de los valores obtenidos en el control (t0), a pesar de no verse reflejado en las diferencias halladas entre éste (t0) y t2 ($p > 0,05$). Así, estos resultados sugieren la posibilidad de desarrollar nuevos protocolos de multiplicación de *B. spinosa* en medios nutritivos libres de PGR, lo cual implica disminuir los costos de manejo, especialmente asociados a la micropropagación clonal y minimizar los efectos negativos que puedan ser causados por el uso de reguladores de crecimiento (Boeri et al., 2019). Por otra parte, el resultado obtenido en t1 (3,47 brotes/explante) fue superior al informado por Kumari et al. (2016) en segmentos nodales de *Bougainvillea spectabilis* y *Bougainvillea peruviana* (1,27 y 2,10 brotes/explante, respectivamente). Además, para lograr estos resultados los autores aplicaron mayores concentraciones del medio nutritivo y de los reguladores de crecimiento utilizados (BAP y AG₃), respecto a los aplicados en este trabajo. No obstante, el 100% de los explantes con brotes obtenidos en el tratamiento t1 surgieron de un callo basal (organogénesis indirecta).

La ausencia de hiperhidricidad observada en t0 y t2, y la mayor elongación de los brotes obtenidos en este último tratamiento, respecto al t0 y t1, reflejan la influencia de factores tales como el tipo de explante, el medio nutritivo y los envases utilizados para el cultivo *in vitro*, sobre la hiperhidricidad (Debergh et al., 1992). Además, ante situaciones de alta retención de agua en los envases, la presencia de BAP (t1) en el medio nutritivo, podría inducir este tipo de desórdenes, tal como lo informó este mismo autor (Debergh et al., 1981).

En lo que respecta a la inducción de callos, Rodríguez-Salazar et al. (2018) obtuvieron un 66% de callos a partir de hojas de *B. glabra* cultivadas con BAP (2 mg/l) y ácido naftalenacético (ANA 1 mg/l). En este sentido, Escandón et al. (2003) también informaron la obtención de callos en diferentes concentraciones de BAP y en ausencia de reguladores de crecimiento, en otras bougainvilleas. Sin embargo, la callogénesis

ha sido también promovida únicamente en presencia de auxinas, en diferentes explantes de *Bougainvillea spp* (Anand et al., 2016). Así, en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo la respuesta de callogénesis observada en todos los tratamientos evaluados podría también estar asociada con el balance endógeno hormonal de estos explantes. Como se mencionó anteriormente, la obtención de callos favorece la variación somaclonal, la producción de embriones somáticos y, particularmente, el desarrollo de callos vítreos como los obtenidos en este trabajo, lo cual representa una ventaja tanto para conservar la variabilidad genética como para la obtención de metabolitos secundarios *in vitro*, aspecto relevante debido al potencial farmacológico de esta especie (Rodríguez Beraud et al., 2014).

Los resultados obtenidos respecto a la inducción de raíces difieren con los informados por Ahmad et al. (2007) quienes obtuvieron un mayor porcentaje de explantes con raíces (75%) en *B. spectabilis*, cuando adicionaron 2.5 mg/l de IBA al medio nutritivo. El bajo porcentaje de explantes con raíces observado en este estudio podría estar relacionado con el balance endógeno de las auxinas y citocininas en la especie. Al respecto, Fanego et al. (2009) indicaron que los bajos porcentajes de enraizamiento de las estacas cultivadas de *B. glabra* estarían asociados con la reducida producción de auxinas endógenas en esta especie. De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *B. spinosa*, podría presentar dificultades para el enraizamiento, tal como ha sido descrito en otras especies del género (Fanego et al., 2009; Lakhotia et al., 2014; Ibironke, 2016).

Respecto a las Semillas sintéticas (SS), los brotes que lograron emerger de las cápsulas no presentaron los síntomas de etiolación (pérdida de color, tallos delgados y débiles) que fueron observados por Ray y Bhattacharya (2008) en *Boerhavia diffusa*. No obstante, bajo la misma temperatura (4°C), periodo de almacenamiento (2 semanas) y tipo de explante, el porcentaje de conversión informado por estos autores fue del orden del 90%, valor superior al obtenido en el presente estudio para *B. spinosa* (13,33%). Dado que los carbohidratos han sido descritos como promotores del proceso de conversión, estas respuestas podrían estar relacionadas con que, a diferencia de las SS de *B. spinosa*, las de *B. diffusa* fueron suplementadas con nutrientes (MS) y sacarosa (Navarro Ureña, 2002). Respecto a la tendencia de oxidación de los tejidos encapsulados a medida que aumentó el tiempo de exposición lumínica de las SS, George y Sherrington (1984) indicaron que las enzimas involucradas tanto en la biosíntesis como en la oxidación de los fenoles se incrementan con la luz, por lo que recomiendan mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja. Además, el almacenamiento a bajas temperaturas ha sido indicado como una estrategia para reducir los problemas de oxidación en explantes (Azofeifa, 2009), lo que explicaría la ausencia de ésta en los tratamientos t1 y t2 durante el periodo que permanecieron a 4°C. Por otra parte, el proceso de oxidación, que se manifiesta con el oscurecimiento y necrosis de los tejidos, ocurre muy frecuentemente en especies leñosas-como es el caso de *B. spinosa*-cultivadas en condiciones *in vitro* y puede comprometer tanto el crecimiento como la viabilidad de los explantes (Hernández y González, 2010).

En cuanto a la callogénesis basal observada en los explantes encapsulados, Ahmad et al. (2010), asociaron esta respuesta con la acumulación de auxinas en el punto de lesión estimula esta proliferación celular.

Los resultados obtenidos a partir del encapsulamiento de las secciones nodales indican que es posible establecer un procedimiento de conservación para *B. spinosa*, durante dos semanas, a 4°C, sin que éstos pierdan la viabilidad y capacidad de conversión. En este sentido, existen evidencias que confirman la idoneidad de una temperatura de incubación baja (4°C o próxima a ella) para el almacenamiento de semillas sintéticas y la conservación exitosa de diversas especies como *Punica granatum* y *Boerhavia diffusa* (Naik y Chand, 2006; Ray y Bhattacharya, 2008). De esta manera, a pesar de las limitaciones por oxidación o callogénesis, la técnica de encapsulación de propágulos constituye una alternativa prometedora, especialmente en el caso de las especies leñosas, que presentan ciertas dificultades para la propagación y conservación (Bapat y Mhatre, 2005). No obstante, será necesario profundizar este conocimiento de modo de lograr el control de ciertas respuestas asociadas al cultivo de tejidos *in vitro* de especies leñosas, como el de la oxidación y la hiperhidricidad.

CONCLUSIONES

Este trabajo permitió generar los primeros avances sobre la propagación sexual en condiciones de cultivo *in vitro* y la micropropagación de *Bougainvillea spinosa*. Ello permitirá contribuir con la estandarización de estas biotécnicas a través de la vía organogénica. El estudio de parámetros

germinativos y la cinética de imbibición de las semillas desprovistas de brácteas permitieron demostrar la falta de latencia física para esta especie. Como consecuencia de un balance hormonal endógeno favorable se obtuvieron brotes adventicios aún en medios nutritivos libres de PGR, lo que genera la posibilidad de multiplicar plantas nativas sin la adición de éstos y disminuir así los costos de manejo asociados al CTV. Por otra parte, la presencia de callos en diferentes condiciones y medios de cultivo podría promover las posibilidades de variabilidad genética, así como de desarrollar protocolos de producción masiva de metabolitos secundarios *in vitro*. Finalmente, este trabajo constituye el primer reporte de la aplicación de semillas sintéticas aplicadas en *Bougainvillea spinosa*, y su posibilidad de aplicarlas para desarrollar protocolos de propagación, conservación *ex situ* y uso sustentable de la especie.

Agradecimientos

Agradecemos a BIOALI-CYED por su apoyo a la investigación científica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca-Vargas, R. & V.L. Petricevich** (2018). *Bougainvillea* genus: A review on phytochemistry, pharmacology, and toxicology. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2018.
- Ahmad, I., Lutfullah, G., Zamir, R. & S.T. Shah** (2007). *In vitro* response of various growth regulators on the regeneration of *Bougainvillea spectabilis* Willd. Suranaree Journal of Science and Technology 14(2): 157-162.
- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M., & I.M. Aref** (2010). *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. South African Journal of Botany 76(3): 597-600.
- Anand, P., Singh, K.P., Prasad, K.V., Kaur, C. & A.K. Verma** (2016). Betalain estimation and callus induction in different explants of *Bougainvillea* spp. Indian Journal of Agricultural Sciences 87: 191-196.
- Azofeifa, Á.** (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana 20(1): 153-175.
- Bapat, V.A. & M. Mhatre** (2005). Bioencapsulation of somatic embryos in woody plants. En: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Dordrecht. Pp: 539-552.
- Baskin, C.C., & J.M. Baskin** (1998). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Elsevier.
- Baskin, C.C. & J.M. Baskin** (2014). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 2nd edition. Academic Press, San Diego, California, USA., 1601 pp.
- Baskin, J.M., Davis, B.H., Baskin, C.C., Gleason, S.M., & S. Cordell** (2004). Physical dormancy in seeds of *Dodonaea viscosa* (Sapindales, Sapindaceae) from Hawaii. Seed Science Research 14(1): 81-90.
- Beider, A.** (2012). Viverización de especies nativas de zonas áridas. Experimentia Revista de Transferencia Científica 2: 9-67.
- Bewley, J. & M. Black** (1994). Seed physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 101pp.
- Boeri, P.A., Espíndola, M., Dalzotto, D., Cedrés Gazo, M.L., Piñuel, M.L. & S. Sharry** (2019). ¿Es necesario suplementar reguladores de crecimiento al medio de cultivo? Respuestas morfogénicas *in vitro* de plantas leñosas de ambientes xerofíticos. En: X Encuentro latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria y XI Simposio Redbio Argentina.
- Bradbeer, J.W.** (1988). Seed dormancy and germination. Blackie. New York.
- Cano Castillo, M.** (2013). Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés (Tesis Doctoral. Universitat d'Alacant-Universidad de Alicante).
- Cassells, A.C. & R.F. Curry** (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64(2): 145-157.
- CDB.** (1992). Convenio sobre la Diversidad Biológica. Río de Janeiro: ONU. <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>

- Chaparro, A., Ruiz, M.B. & C.A Parera** (2005). *Bougainvillea spinosa* Cav. fisiología de la germinación. Jornadas Argentinas de Botánica 30. Rosario, Santa Fe. Argentina.
- Cordal, M.B., Adema, M., Briones, V., Villarreal, B., Panarisi, M.H., Abedini, W. & S. Sharry** (2014). Induction of somatic embryogenesis in *Phytolacca tetramera*, medicinal species of Argentina. Emirates Journal of Food and Agriculture 26(6): 552-557.
- Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R. & M. Ziv** (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. Plant cell, Tissue and Organ Culture 30(2): 135-140.
- Debergh, P., Harbaoui, Y. & R. Lemeur** (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiology Plant 53:181-187.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & C.W. Robledo** (2020). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Escandón, A.S., Ferrari, P., Facciuto, G., Soto, S., Hagiwara, J.C. & A. Acevedo** (2003). Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Hibr) Una arbustiva de relevancia ornamental. Revista de Investigaciones Agropecuarias 32(1): 111-122.
- Espíndola, M.B.** (2021). Aplicación de biotecnologías para la propagación y conservación de "monte negro" (*Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl.) Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Negro. UNRN.
- Estomba, D., Fernández, H.M. & A.M. Stella** (2010). Antioxidantes y porfirinas de *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* y *Atriplex lampa* cultivadas *in vitro*. Revista de Facultad de Ciencias Agrarias 42 (2): 135-142.
- Fanego, A., Soto, R. & S. Martínez** (2009). Brotación y enraizamiento de estacas procedentes de diferentes secciones de las ramas de *Bougainvillea glabra* Choisy. Centro Agrícola 36(9).
- Ferrando Pardo, I., Ferrer-Gallego, P.P., Navarro Castilla, Á. & E. Laguna Lumbreras** (2008). Acciones de conservación *ex situ* de la población europea de "*Boerhavia repens*" L. subsp. "*repens*" (*Nyctaginaceae*). <https://roderic.uv.es/handle/10550/45376>. Último acceso: julio del 2022.
- George, F. & P. Sherrington** (1984). Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Basingtokes, England: 109 pp.
- González, M., Quiroz, I., Gracia, E. & B. Gutiérrez** (2008). Escarificación química con ácido sulfúrico como tratamiento pregerminativo para semillas de toromiro (*Sophora toromiro* Skotts.). Ciencia e Investigación Forestal 14(1): 111-118.
- Hernández, Y. & M.E. González** (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos tropicales 31(4): 58-69.
- Ibironke, O.A.** (2016). Effects of rooting hormones on the propagation of *Bougainvillea* from cuttings. International Journal of Research 57. <http://www.ijraf.org/pdf/v3-i1/9.pdf>. Último acceso: julio del 2022.
- IPBES** (2019). Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity Ecosystem Services. S. Díaz, J. Settele, E.S. Brondízio E.S., H.T. Ngo, M. Guèze, J. Agard, A. Arneth, P. Balvanera, K.A. Brauman, S. H.M. Butchart, K.M.A. Chan, L.A. Garibaldi, K. Ichii, J. Liu, S.M. Subramanian, G.F. Midgley, P. Miloslavich, Z. Molnár, D. Obura, A. Pfaff, S. Polasky, A. Purvis, J. Razzaque, B. Reyers, R. Roy Chowdhury, Y.J. Shin, I.J. Visseren-Hamakers, K.J. Willis, & C.N. Zayas (eds.). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 56 pp.
- Jain, N.K. & J.R. Saha** (1971). Effect of storage length on seed germination in Jute (*Corchorus* spp). Agronomy Journal 63: 636-638.
- Karlin, M. & R. Accietto** (2014). Viverismo de especies nativas. Cartilla técnica. Córdoba, Argentina: El Cuenco Equipo Ambiental. https://www.researchgate.net/publication/337915446_Viverismo_de_especies_nativas. Último acceso: julio de 2022.
- Karuppusamy, S.** (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3:1222-1239.
- Kumari, P., Swaroop, K., Janakiram, T., Singh, S. K., Prasad, K. V. & J. Ritu** (2016). *In vitro* protocol for mass multiplication in *Bougainvillea* (*Bougainvillea* sp) cv. Mahatma Gandhi and Refulgens. Indian Journal of Agricultural Sciences 86(8): 1031-1036.

- Lakhotia, P., Singh, K.P., Singh, S.K., Singh, M. C., Prasad, K.V., & K. Swaroop** (2014). Influence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in *Bougainvillea* callus cultures. *Indian Journal of Horticulture* 71(3): 373-378.
- Méndez, N. J. R., Merazo, P. J. F., & M.N.J. Montaña** (2008). Relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación en semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Mill.). *Revista UDO Agrícola* 8(1): 61-62.
- Murashige, T. & F. Skoog** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.
- Naik, S. K., & P.K. Chand** (2006). Nutrient-alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. *Scientia Horticulturae* 108(3): 247-252.
- Navarro Ureña, J.A.** (2002). Encapsulamiento de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*) para la crioconservación y la propagación en invernadero. Proyecto de Graduación (Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología) Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. <https://hdl.handle.net/2238/171>.
- Pece, M., Gaillard, C., Acosta, M., Bruno, C., & S. Saavedra** (2010). Tratamientos pregerminativos para Tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul.). *Foresta veracruzana* 12(1): 17-25.
- Ray, A., & S. Bhattacharya** (2008). Storage and plant regeneration from encapsulated shoot tips of *Rauvolfia serpentina*—an effective way of conservation and mass propagation. *South African Journal of Botany* 74(4): 776-779.
- Rodríguez Araujo, M.E.** (2021). Rehabilitación ecológica de sitios degradados por disturbios severos en el Monte Austral Neuquino: evaluación de la siembra directa con especies nativas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. UNLP.
- Rodríguez Beraud, M.M., Latsague Vidal, M.I., Chacón Fuentes, M.A. & P.K. Astorga Brevis** (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque* 35(1): 111-118.
- Rodríguez-Salazar, C.M., Roman-Reynosa, J., Avila-Reyes, S.V., Loring-Younce, F., Jiménez-Aparicio, A.R. & S. Evangelista-Lozano** (2018). Cellular forms in cultivation in suspension of *Bougainvillea glabra* Choisy Variety Surprise. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 8: 203-211.
- Saleem, H., Usman, A., Mahomoodally, M. F., & N. Ahemad** (2021). *Bougainvillea glabra* (choisy): A comprehensive review on botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. *Journal of ethnopharmacology* 266: 113356.
- Sharry, S., Adema, M., & W. Abedini** (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata. UNLP Argentina.
- Skoog, F. & C. Miller** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In Vitro Symposia of the Society for Experimental Biology*.
- Trujillo, E.** (1996). Análisis y pruebas rápidas de la calidad de las semillas. En: Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales, Unidad 3: Recolección y manejo de semillas forestales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 152 pp.
- Varela, S.A. & A.G. Aparicio** (2011). Aspectos básicos sobre semillas y frutos de especies forestales. Recomendaciones para su cosecha. Serie técnica Sistemas Forestales Integrados Área Forestal-INTA EEA Bariloche. Silvicultura en vivero, Cuadernillo, 1.
- Verdes, P.** (2007). Micropropagación de *Prosopis caldenia* Burk.: estado actual y perspectivas. *Revista Científica Agropecuaria* 11(1): 45-51.
- Wani, S.H., Kumar, V., Shriram, V. & S.K. Sah** (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* 4(3): 162-176.