

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

Juan Pablo Gómez-Posada, María del Carmen Hernández-León, Legna de la Caridad Martínez-Ojeda, Ada Teresa Aguiar-Fernández, Jericy Álvarez-Ferreiro, Aydiloide Bernal-Villegas, Rafael Gómez-Kosky*

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) UEB INICA-Villa Clara
Autopista Nacional, km 246. Villa Clara, Cuba
*rafael.kosky@inicavc.azucuba.cu

RESUMEN

Introducción. Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una planta oleaginosa, perenne y trepadora. Su aceite está considerado el mejor del mundo por cualidades de color, sabor, olor y beneficios nutricionales para la salud humana. Una de las principales limitaciones es la falta de continuidad en el abastecimiento de la semilla, ante esta situación la propagación *in vitro* es una de las alternativas para empezar a desarrollar el potencial agroindustrial de la especie.

Objetivo. Lograr el establecimiento y la multiplicación de brotes *in vitro* de esta especie.

Materiales y métodos. Se evaluaron tres diferentes tipos de explantes iniciales, para el establecimiento de brotes o plantas *in vitro* (semillas maduras, inmaduras y segmentos nodales), así como diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los explantes en hipoclorito de sodio, además de las NPs-Ag en el medio de cultivo. También se evaluó el efecto de la sacarosa, agua de coco y floriglucinol en los medios de cultivo, durante las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro*.

Resultados y discusión. Se alcanzó la germinación *in vitro* de las semillas inmaduras sin testa de sachá inchi, en un medio de cultivo con agua de coco a 100 mL L⁻¹, además de un alto porcentaje de segmentos nodales libres de contaminantes con la presencia de las NPs-Ag en el medio de cultivo.

Conclusiones. La combinación de los reguladores del crecimiento 6-BAP y ANA junto con el floriglucinol a 30.0 mg L⁻¹ permitió la multiplicación *in vitro* de los brotes apicales obtenidos de plantas de semillas inmaduras, sin formación de callo basal.

Palabras clave. Propagación *in vitro*, floriglucinol, sachá inchi, reguladores del crecimiento, plantas *in vitro*.

ABSTRACT

Introduction. Sachá inchi is an oleaginous, perennial and climbing plant. Its oil is considered the best in the world due to its color, taste, smell and nutritional benefits for human health. One of the main limitations is the lack of continuity in the seed supply. *In vitro* propagation is one of the alternatives to start developing the agroindustrial potential of the species.

Objective. To achieve the *in vitro* establishment and multiplication of shoots in this species.

Materials and methods. Three different types of initial explants were evaluated for the establishment of shoots or plants *in vitro* (mature seeds, immature seeds and nodal segments), as well as different concentrations and exposure times of the explants in sodium hypochlorite, and the Ag-NPs in the culture medium. The effect of sucrose, coconut water and floriglucinol in the culture media during the establishment and multiplication phases *in vitro* was also evaluated.

Results and discussion. *In vitro* germination of immature seeds without testa, of sachá inchi, was achieved in a culture medium with coconut water, at 100 mL / L⁻¹, in addition to a high percentage of nodal segments

free of contaminants with the presence of the NPs-Ag in the culture medium.

Conclusions. The combination of the growth regulators 6-BAP and ANA together with floriglucinol at 30.0 mg L⁻¹ allowed in vitro multiplication of apical shoots, obtained from immature seedlings, without basal callus formation.

Keywords. *In vitro* propagation, phloroglucinol, sacha inchi, growth regulators, in vitro plants.

INTRODUCCIÓN

Los aceites vegetales constituyen una alternativa para atender las demandas energéticas, alimentarias y agroindustriales de países tropicales en desarrollo y países desarrollados. Según informes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en los últimos decenios, 20 de cada 100 kilocalorías consumidas por las poblaciones de estos países provienen de cultivos oleaginosos (1). Estos cultivos están entre los más dinámicos pero, hasta el momento, solo se han usado algunas especies, como: palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), soya (*Glycine max* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y colza (*Brassica napus* L.) (2). El manejo de los aceites vegetales en la nutrición humana ha adquirido especial relevancia y los alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados, tipo omega, son un tema actual de investigación (3).

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una planta oleaginosa, perenne y trepadora, que crece en países como Perú, Bolivia, Venezuela, Colombia y Brasil. Es autóctona de la Amazonía peruana, conocida en el mundo como el maní del inca, por su enorme importancia durante el esplendor del imperio indoamericano; este prodigio natural, entre sus múltiples beneficios, presenta una de las fuentes vegetales más grandes de ácidos grasos poliinsaturados: Omega (3, 6 y 9), un ácido graso esencial para la vida del ser humano; además de proteínas (33 %) y antioxidantes (50 %). El aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) está considerado el mejor del mundo, por sus cualidades: color, sabor, olor y beneficios nutricionales para la salud humana. Su consumo le da energía al cerebro, limpia el torrente sanguíneo y lleva los nutrientes a las células (4, 5).

Los alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados tipo omega, por una parte, desempeñan un papel importante en la prevención y el tratamiento de las enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes tipo II, artritis reumatoide, colitis ulcerosa; así como en enfermedades renales, también en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y en otras inflamatorias, autoinmunes y en el cáncer (6, 7). Estos aceites vegetales insaturados son el componente básico empleado para muchas formulaciones cosméticas, por sus innumerables propiedades hidratantes y antioxidantes (4).

Por otra parte, el análisis de calidad de los aceites para fines agroindustriales concluye que los altos índices de yodo, en correspondencia con el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, le confieren al aceite de *Plukenetia volubilis* L. propiedades secantes, condición de gran utilidad en la industria oleoquímica, para la fabricación de barnices y revestimientos (8, 3).

Debido a las cualidades de los aceites de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), el fruto se ha ido consolidando en un mercado promisorio para la comercialización de productos elaborados, a partir de éstos aceites (4). Sin embargo, la producción de materias primas es insuficiente y esto resulta un obstáculo para la exportación y la competencia en el mercado (9). Una de las principales limitaciones de la semilla de *Plukenetia volubilis* es la falta de continuidad en el abastecimiento y, por ello, la propagación *in vitro* es una de las mejores alternativas para desarrollar el potencial agroindustrial de la especie.

Actualmente, la propagación de esta planta se hace solo por semilla, lo que implica alta variabilidad en el material vegetal y, por tanto, pueden perderse las características deseadas por los cultivadores; además de reducir la disponibilidad de material vegetal para la obtención de aceites. También, las semillas tienen una pobre viabilidad, un bajo porcentaje de germinación, baja resistencia a enfermedades y un enraizamiento lento de los brotes al germinar (10, 3).

Hasta la fecha, las investigaciones del cultivo *in vitro* son escasas a nivel internacional y en todas ellas se señala, como problema, la formación de un callo en la base del brote, que impide la toma de nutrientes en la fase de multiplicación y la conexión de las raíces con el tallo durante el enraizamiento (11, 10, 12, 13); además, en Cuba, hasta hoy, tampoco se han informado trabajos de propagación *in vitro* para *Plukenetia volubilis*, de ahí que el objetivo del presente trabajo sea lograr el establecimiento y la multiplicación de brotes *in vitro* de sachá inchi (*P. volubilis*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en las áreas del Complejo Científico Productivo de Biotecnología, del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (UEB INICA-Villa Clara), ubicada en el Municipio de Ranchuelo, provincia de Villa Clara.

Procedimientos generales

Esterilización del medio y frascos de cultivo e instrumental

Los medios, tubos y frascos de cultivo utilizados fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1.2 kg cm⁻² de presión. Los platos metálicos para el trabajo en la cabina de flujo laminar fueron esterilizados en la estufa a 180 °C, durante 2 h. El instrumental (pinzas y bisturíes) se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ (Alemania), que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar horizontal, en el que se realizó el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad.

Condiciones de cultivo in vitro

Los tubos y frascos de cultivo con los explantes de todos los experimentos se colocarán en cámara de crecimiento climatizada a una temperatura de 25±2 °C, con luz solar, con un fotoperiodo de 12.5 /11.5 h de luz / oscuridad con un rango de densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (DFFF) entre 47.1 y 64.6 μmol m⁻² s⁻¹; medido con un luxómetro PCE-174 Instruments (España), además, se especifican otras condiciones de cultivo que fueron empleadas.

Efecto del tipo de explante y medio de cultivo en el establecimiento in vitro de sachá inchi

Se emplearon frutos maduros e inmaduros de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) que tenían entre 5-6 semillas por fruto, estos fueron donados por el Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Bioproductos Naturales (CIPB), perteneciente al Consejo de Ministros.

Semillas maduras

Las semillas fueron extraídas de los frutos, con ayuda de una tijera de podar y, posteriormente, se procedió a su desinfección en el laboratorio, se realizaron los diferentes procedimientos para la desinfección: lavado con jabón líquido (detergente doméstico) se adicionaron 3-5 mL por cada 250 mL de agua durante 15 min, con la ayuda de un cepillo plástico y enjuagues posteriores, con agua, para eliminarlo.

A continuación, en el laboratorio se realizó otra desinfección, en recipientes previamente esterilizados con etanol al 70 %, durante un minuto. En la cabina de flujo laminar, con el auxilio de una pinza estéril, se eliminó el etanol y se colocaron las semillas en un frasco con solución de hipoclorito de sodio al 3.0 % (v/v), durante 30 min, según Restrepo *et al.* (14). Finalmente, se realizaron tres enjuagues con agua desmineralizada estéril. Las semillas maduras fueron colocadas en un frasco de cultivo estéril con una solución de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales (15) (MS), al 50 % de su concentración y como gelificante agarE (BIOCEN, Cuba) a 5.0 g L⁻¹. El tratamiento fue un medio de cultivo

con 20 g L⁻¹ de sacarosa y otro sin esta. El pH se ajustó a 5.4 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N) previo a la esterilización.

Se emplearon 25 tubos de cultivo, de vidrio, de un tamaño de 16 x 2 cm, con 10 mL de medio de cultivo por tratamiento, con las semillas desinfectadas fueron colocados en cámara de cultivo, en condiciones de oscuridad total y a una temperatura de 22 ± 2 °C, hasta que salió la radícula. Posteriormente, fueron cultivadas en condiciones de luz, según lo descrito en procedimientos generales.

Semillas inmaduras

Una vez extraídas las semillas de los frutos inmaduros (verdes) se realizó la desinfección, se siguieron los mismos pasos que con las semillas maduras. En la cabina de flujo laminar, con el auxilio de una pinza estéril, se eliminó la testa que cubre la semilla, para extraer los endospermos con el embrión cigótico, los que fueron colocados en tubos de cultivo, iguales a los anteriormente señalados.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales (15) (MS), vitaminas (16) al 100 % de sus concentraciones, carbón activado 2 g L⁻¹ y como gelificante, agarE (BIOCEN, Cuba), a 5 g L⁻¹. El tratamiento fue un medio de cultivo con agua de coco 100 mL L⁻¹ y otro sin este endospermo líquido. El pH se ajustó a 5.4 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N), previo a la esterilización.

Se emplearon 25 tubos de cultivo de vidrio, de un tamaño de 16 x 2 cm, con 10 mL de medio de cultivo por tratamiento. Estos con las semillas inmaduras desinfectadas fueron colocados en cámara de cultivo, en condiciones de oscuridad total y a una temperatura de 22 ± 2.0 °C, hasta que salió la radícula. Posteriormente, fueron cultivadas en condiciones de luz, según lo descrito en procedimientos generales.

Para ambos tipos de semilla se evaluaron las variables:

- a los 15 días de cultivo: número de semillas contaminadas con bacterias y hongos, así como oxidación fenólica o amarronamiento
- a los 60 días: número de semillas vivas, número de semillas muertas y número de semillas que germinaron (en porcentaje)

Segmentos nodales

Plantas madres en condiciones semicontroladas de cultivo

Las semillas maduras fueron sembradas en tubetes plásticos, de color negro (tamaño de 15.0 cm x 4.0 cm), con una mezcla de compost de cachaza y zeolita (3:1) para obtener las posturas. El riego fue por aspersión, 3 veces al día, con una duración de 10 min. Una vez germinadas las semillas y crecidas las plantas, a los 85-90 días de cultivo, con una altura entre 25-30 cm, estas se llevaron al Banco de donante semicontrolado, para su crecimiento y desarrollo con el objetivo de obtener plantas madres.

Banco de donantes semicontrolado

Se utilizaron, para la plantación de las posturas (8 en total), tanques plásticos con una capa de grava en el fondo y rellenos con una mezcla de compost de cachaza y zeolita 3:1 (v/v) para un volumen de 20 m³; además, como protección fitosanitaria se utilizó un badén para los pies y un lavamanos con formol o hipoclorito de sodio al 0.1 %. El riego fue por microaspersores, con una frecuencia de dos veces por día, sobre todo en el horario del mediodía y la tarde, cuando la temperatura es más alta.

Como sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una planta de crecimiento indeterminado se le colocó, a cada planta, un tutor de caña energética (cultivar C90-176) previamente cortado, secado al sol durante 15 días, al que se le eliminaron las yemas axilares, cuando estas plantas alcanzaron una

altura mayor de 1.50 m, se les colocaron dos alambres en forma transversal, para orientar su crecimiento. Previamente, se les había realizado una poda de la yema apical, que provocó la brotación y crecimiento de las yemas laterales, esto permitió que, a las nuevas ramas con los brotes, les fuera también orientado su crecimiento, en los alambres colocados con ese fin (figura 1).

A las plantas madres de sachá inchi se les realizaron pretratamientos con diferentes productos, como: FITOMAS-E®, (ICIDCA, Cuba) 1.0 mL L⁻¹, fertilizante foliar Bayfolan forte®, (Bayer Crop Science, Alemania) 2,0 mL L⁻¹ y fungicida sistémico Regnum® 0.65 mL L⁻¹ (BASF, Alemania) por mochila, respectivamente, que fueron aplicados una vez por semana, durante los primeros tres meses, con mochila de aspersión (Matabi, España), de 16 L de capacidad. A partir de los 4 meses se les realizaron aplicaciones foliares de urea (10 g L⁻¹), cada 15 días; todo ello para contar con un material vegetal con una mayor calidad sanitaria y fisiológica y lograr una mejor respuesta en la fase de establecimiento *in vitro*.



Figura 1. Plantas madres de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), a los seis meses de edad, en el Banco de donantes semicontrolado, utilizadas para la toma de los segmentos nodales y su establecimiento *in vitro*.

Condiciones de cultivo en el Banco de donantes semicontrolado

Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (DFFF), en un rango de 209.4 a 1036 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medido con el auxilio de un luxómetro digital (modelo Multimatrix LM 76, E.U.A). Los valores de Humedad Relativa (HR) fueron una mínima de 49.5 % y una máxima de 81.9 %. La temperatura presentó los valores: mínimo de 27.1 °C y máximo de 39 °C, con la utilización de un termohigrómetro (modelo Ebro Electronic® TFH 620, EUA).

Selección de los explantes de partida

De las plantas madre fueron seleccionadas ramas jóvenes en pleno crecimiento, de cuatro a seis meses de edad, en el Banco de donantes semicontrolado. La toma de los explantes (segmentos nodales) fue realizada en horas tempranas de la mañana; para el corte se tuvo en cuenta que los segmentos nodales utilizados fueran los comprendidos entre el primer y quinto par de hojas, a partir de la yema apical, con un grosor no superior a 0.2 cm. Se les eliminaron las hojas con una tijera de podar y se dejó solo un pequeño fragmento del peciolo de 3-5 mm. Para el traslado al laboratorio, los explantes cortados fueron colocados en frascos de cultivo cerrados, con agua destilada.

En el laboratorio se realizaron diferentes pasos para la desinfección. Lavado con agua bajo la llave, durante una h. Lavado con detergente líquido doméstico con la adición de 3-5 mL por cada

250 mL de agua. Se realizó el lavado durante 30 min en agitación, se empleó un agitador magnético y se enjuagaron, posteriormente, con agua para eliminar el detergente.

Posteriormente, los segmentos nodales fueron individualizados, con ayuda de una tijera de podar o bisturí. Después se realizó una primera desinfección de los segmentos nodales individuales, en recipientes previamente esterilizados y con etanol al 70 %, durante 30 s, con agitación manual. A continuación se eliminó el etanol dentro de la cabina de flujo laminar, con el auxilio de una pinza estéril.

Experimento 1

Para la etapa final del proceso de desinfección, los segmentos nodales fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO). Se evaluaron ocho tratamientos 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 % (v/v) de NaClO, durante dos tiempos de exposición al desinfectante, de 15 y 20 min en agitación, según el Manual práctico de propagación in vitro (17).

Después de la desinfección con hipoclorito de sodio fueron realizados tres enjuagues en la cabina de flujo laminar, con agua destilada estéril. Los segmentos nodales, después de desinfectados, fueron colocados en una solución estéril de ácido ascórbico, a una concentración de 100 mg L⁻¹, que fue esterilizada en autoclave con anterioridad.

Una vez realizada la desinfección de los segmentos nodales se siguieron los pasos para el establecimiento de los explantes, en la cabina de flujo laminar. Se redujo el tamaño del explante entre 2.0 y 2.5 cm, aproximadamente. Para este procedimiento, se eliminaron ambos extremos del segmento, porque en esa zona hay un mayor daño por el desinfectante. A continuación, se introdujeron los segmentos nodales en los tubos de cultivo de vidrio, de un tamaño de 16 x 2 cm, con 2 mL de una solución de 10 g L⁻¹ de sacarosa con agua desmineralizada para evaluar la contaminación microbiana. Los tubos fueron tapados con láminas de aluminio de 0.2 µM.

Experimento 2

A partir de los resultados del primer experimento se evaluó el efecto de un mayor tiempo de exposición al NaClO. Se establecieron dos tratamientos, mayor tiempo de exposición de los segmentos nodales al NaClO (30 min) y un segundo tratamiento con una doble desinfección con hipoclorito de sodio (primero durante 20 min y después del etanol al 70 % otra con igual concentración, durante 30 min).

Experimento 3

El experimento 3 tuvo como objetivo evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en la etapa final del proceso de desinfección de los segmentos nodales. Se tomaron como base los resultados del experimento 2.

Nanopartículas de plata (NPs-Ag)

Fueron sintetizadas en el Centro de Estudios Avanzados (CEA) del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medioambiente (CITMA), en La Habana, Cuba. Las nanopartículas eran de forma esférica, dispersadas en agua destilada, con un diámetro hidrodinámico promedio de 63.54 nm y con un potencial zeta (mV) -39.1.

Los pasos de la desinfección fueron los mismos de los experimentos anteriores hasta el etanol al 70 %. A partir de este paso se estudiaron dos tratamientos: (1) Concentración de NaClO del experimento 2 + la adición de NPs-Ag (300 mg L⁻¹) al medio de cultivo. (2) Doble desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) primero durante 20 min y después del etanol al 70 %, y la 3 con igual concentración durante 30 min (Control).

Todos los tubos de cultivo de vidrio con los segmentos nodales de los tres experimentos fueron colocados bajo condiciones de oscuridad total, a una temperatura de 24 ± 2.0 °C durante una

semana. Posteriormente se colocaron en cámara de crecimiento, en las condiciones de cultivos señaladas en procedimientos generales. Se utilizaron 25 tubos de cultivo como repeticiones por tratamiento, con un segmento nodal en cada uno.

Las evaluaciones se realizaron a los 15 días de cultivo, para las variables número de segmentos nodales contaminados y con oxidación fenólica o amarronamiento y a los 45 días de cultivo, para las siguientes variables: número de segmentos nodales vivos, muertos y brotados. Los datos fueron convertidos a porcentaje.

Multiplicación *in vitro* de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

A las plantas *in vitro* obtenidas del mejor explante les fueron cortadas las raíces y la zona apical fue colocada en el medio de cultivo de multiplicación para sachá inchi, según el Manual práctico de propagación *in vitro* (17). Se conformaron dos tratamientos con la presencia del floroglucinol a la concentración de 30.0 mg L⁻¹, sin este. El medio de cultivo fue: sales (MS) al 100 % de su concentración, vitaminas (16) al 100 %, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mL L⁻¹ de agua de coco, 1.0 mg L⁻¹ 6-bencilamino purina (6-BP), 0.5 mg L⁻¹ de ácido naftalen acético (ANA), 2 g L⁻¹ de carbón activado y gelificado con 6 g L⁻¹ de agarE (BIOCEN, Cuba). El pH se ajustó a 5.4 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N) previo a la esterilización.

Los explantes fueron colocados en frascos de cultivo de vidrio de 250 mL de volumen total, con 30 mL de ambos medios de cultivo. Se colocaron 3 explantes por frasco, para un total de 30 por tratamiento. Los frascos fueron tapados con papel de aluminio doble.

En todos los tratamientos se evaluaron las variables, a los 30 días de cultivo: altura (cm), coeficiente de multiplicación (número de segmentos nodales por brote), número de hojas, formación de callo basal (porcentaje).

Análisis estadístico

El diseño experimental para todos los experimentos fue completamente aleatorizado. En el análisis de la normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas por Levene. Se utilizó el Paquete Estadístico SPSS, versión 23.0 del 2015 para Windows (IBM, 2013) y STATISTICA versión 12.0 para la variable expresada en porcentaje, la diferencia entre los valores se determinó mediante la prueba de comparación de proporciones para dos muestras. Para la comparación entre las medias se aplicó un Análisis de varianzas (ANOVA simple) y la diferencia entre las medias se determinó por la prueba de Tukey. En todos los casos las diferencias significativas fueron establecidas para $p < 0.05$. Todos los experimentos fueron repetidos dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tipo de explante y medios de cultivo en el establecimiento *in vitro* de sachá inchi

Semillas maduras

Los resultados alcanzados con el protocolo de desinfección para las semillas maduras fueron positivos. Se obtuvieron muy bajos porcentajes de contaminación por microorganismos, solo bacterias y con porcentajes bajos (15.6 a 12.8 %) a los 15 días de cultivo. Sin embargo, el porcentaje de germinación fue nulo en el medio de cultivo sin sacarosa y muy bajo con la presencia de este carbohidrato. Solo en esta concentración, a los 60 días de cultivo, se logró la germinación de dos semillas, un 8.0 % del total (tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la sacarosa en el medio de cultivo sobre la germinación *in vitro* de semillas maduras de sachá inchi (*P. volubilis* L.), a los 15 y 60 días de cultivo

Sacarosa (g L ⁻¹)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertas (%)	Vivas (%)	Germinación (%)
				Bacterias	Hongos	Total			
0.0	3.0	30	0	15.6 a	0	15.6 a	0.0	100 a	0.0 b
20.0	3.0	30	0	12.8 a	0	12.8 a	0.0	100 a	8.0 a

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0,05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$).

Estos resultados se deben a que las semillas fueron colocadas *in vitro* completas, sin la eliminación de la testa, lo que hizo que el proceso de dormancia y germinación, por la acción de factores externos (agua, humedad, oscuridad) no tuvieran un efecto en estos para las semillas de sachá inchi. Al respecto, Obdulio (18), Restrepo *et al.* (14) y Henao *et al.* (13) señalaron la necesidad de eliminar la testa de las semillas en esta especie para garantizar adecuados porcentajes de germinación. Todos estos autores utilizaron en el protocolo de desinfección la combinación de etanol al 70 % e hipoclorito de sodio entre 2.0 y 3.0 % con tiempos entre 20 y 30 min. Los resultados alcanzados en el presente trabajo apoyan lo informado por estos autores.

Semillas inmaduras

Al repetir el protocolo de desinfección se alcanzaron resultados similares que al utilizar semillas maduras: No presencia de contaminación por hongos y bajo porcentajes por bacterias, a los 15 días de cultivo. Al emplear semillas inmaduras, a las que se les eliminó la cubierta (testa), se obtuvieron mejores resultados en el porcentaje de germinación que al utilizar semillas maduras y completas. Se alcanzó un 66.8 % de germinación a los 60 días de cultivo y un 88.0 % de semillas vivas, cuando al medio de cultivo se le adicionó el agua de coco (tabla 2).

Tabla 2. Efecto del agua de coco en el medio de cultivo sobre la germinación *in vitro* de semillas inmaduras sin cubierta de sachá inchi (*P. volubilis* L.), a los 15 y 60 días de cultivo

Agua de coco (mL L ⁻¹)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertas (%)	Vivas (%)	Germinación (%)
				Bacterias	Hongos	Total			
0	3.0	30	0	19.6	0	19.6 a	8.0	92.0 a	18.4 b
100	3.0	30	0	16.5	0	16.6 a	12.0	88.0 a	66.8 a

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0,05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$).

La combinación de la eliminación de la testa a las semillas inmaduras y la presencia del agua de coco en el medio de cultivo permitió alcanzar altos porcentajes de germinación en las semillas de sachá inchi (figura 2). El empleo del agua de coco en los medios de cultivo constituye uno de los compuestos naturales que se adicionan en la regeneración de plantas tanto vía organogénesis como embriogénesis somática (19).

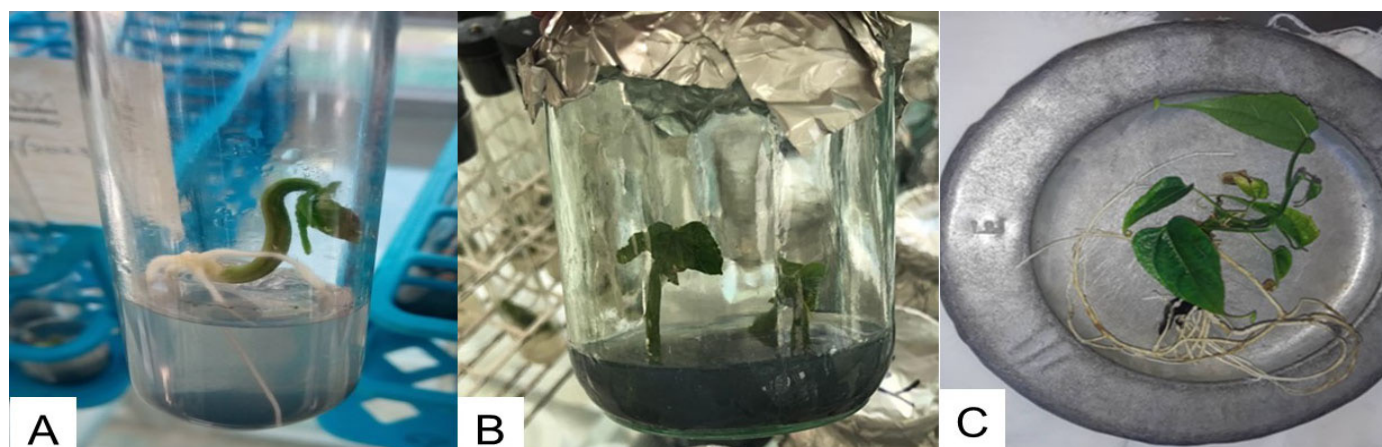


Figura 2. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras sin testa de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) (A). Inicio de la germinación a los 15 días de cultivo. (B) Crecimiento de las raíces y el hipocótilo a los 25 días de cultivo (C) Planta completa *in vitro*, obtenida a los 30 días de cultivo.

Según Del Pozo *et al.* (20) el agua de coco contiene diversidad de hormonas con acción citoquinina, del tipo isoprenoide, que están implicadas en el proceso de división celular; y, también aromáticas, implicadas en procesos posgerminativos. El efecto de las citoquininas contenidas en el agua de coco, especialmente las de tipo isoprenoide, podría tener una implicación en la regulación del ciclo celular, por su efecto sobre la síntesis de DNA y a través de su efecto sobre la elongación de la célula, procesos claves durante la germinación. Igualmente, estas hormonas han sido implicadas en procesos de diferenciación, condición inherente al desarrollo de una plántula a partir del embrión, lo que apoya aún más su efecto promotor en la germinación.

La adición de agua de coco podría bastar para suplir a la semilla con niveles y tipos adecuados de estas hormonas, que permitan romper la latencia observada en semillas bajo condiciones naturales. Al respecto, el Manual práctico de propagación *in vitro* (17) propone, en el protocolo para la germinación de embriones cigóticos de semillas inmaduras, la adición de 100 mL de agua de coco en el medio de cultivo. Los resultados de la presente investigación apoyan lo informado.

También Ovalles *et al.* (21) señalaron que el agua de coco (*Cocos nucifera* L) es rica en nutrientes y su composición específica depende de la madurez del fruto, a menor madurez mayor concentración de nutrientes (22). El agua de coco contiene citoquinina, como se ha informado anteriormente que, entre otras funciones, promueve la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas, al estimular la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz (23, 20). Otros autores como Bertolini *et al.* (24) informaron el uso del agua de coco para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Rhynchosstele bictoniensis* (Bateman). También, en esta especie Soto y Salazar (25) alcanzaron porcentajes de germinación superiores al 70 %.

Segmentos nodales

Experimento 1

Los resultados alcanzados en el primer experimento con segmentos nodales, con el protocolo de desinfección empleado y distintas concentraciones de hipoclorito fueron nulos. En los tratamientos con las concentraciones más bajas de NaClO se observó la presencia de contaminación por hongos. Sin embargo, a partir de 1.5 % y 20 min y en el resto de los tratamientos evaluados hubo solo contaminación por bacterias, lo cual demuestra la efectividad del pretratamiento a las plantas madres con el fungicida sistémico (Regnum®), dos semanas previas a la toma de los segmentos nodales. No obstante, es necesario señalar que los valores de contaminación por estos microorganismos fueron altos para un protocolo de desinfección (tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos nodales de sachá inchi (*P. volubilis* L.) a los 15 días de cultivo

Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
			Bacterias	Hongos	Total		
1.0	15	0	95.8	5.2	100	0	100
1.0	20	0	97.7	2.3	100	0	100
1.5	15	0	97.8	2.2	100	0	100
1.5	20	0	100	0	100	0	100
2.0	15	0	100	0	100	3.4	96.6
2.0	20	0	100	0	100	4.1	95.9
2.5	15	0	100	0	100	4.4	95.6
2.5	20	0	100	0	100	4.7	95.3

Al respecto, Solis *et al.* (12) informaron alcanzar éxitos en el establecimiento *in vitro*, con la utilización como explante de yemas apicales de plantas cultivadas en invernadero. También, como parte del proceso de desinfección, el uso del hipoclorito de sodio al 1.0 %, durante 10 min.

Los resultados informados en el presente trabajo difieren de los informados por estos autores. Sin embargo, es importante destacar que extrajeron meristemas a las yemas una vez desinfectadas, lo cual pudo reducir ampliamente los porcentajes de contaminación, al trabajar con tejido muy pequeño (menor a 1 mm).

Según Guevara *et al.* (26) el establecimiento de plantas leñosas en cultivo *in vitro* es difícil; la desinfección de los explantes es un paso esencial para el éxito de este tipo de cultivo *in vitro*. La contaminación puede originarse por contaminantes que vienen adheridos a la superficie del explante o por fallas en los procedimientos de laboratorio. El mantenimiento de plantas donadoras, bajo condiciones de invernadero o vivero y pretratarlas con sustancias antimicrobianas disminuye los procesos de infección (27).

Experimento 2

Se obtuvieron los mismos resultados del experimento anterior, a pesar de la doble desinfección con el hipoclorito de sodio en el tratamiento 2. Nuevamente, fue imposible eliminar las bacterias con el protocolo de desinfección empleado (tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la exposición de los segmentos nodales de sachá inchi (*P. volubilis* L.) al hipoclorito de sodio a los 15 días de cultivo

Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
					Bacterias	Hongos	Total		
2.5	30	-	-	0	100	0	100 a	0	100
2.5	20	2.5	30	0	100	0	100 a	10	90.0

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0,05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$).

El hipoclorito de sodio ha sido utilizado tradicionalmente solo o en combinación con otras sustancias químicas en la desinfección de los materiales vegetales a establecer *in vitro*, por su alto potencial redox 1.36 eV (28). En cada protocolo para el establecimiento de especies vegetales es necesario ajustar su concentración y tiempo de exposición a este. En general, se han usado con-

centraciones desde 1.0 a 6.0 %, en dependencia de las características morfológicas e higiénicas del material vegetal a establecer (29).

Experimento 3

Los mejores resultados se alcanzaron en el tratamiento con la presencia de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) en el medio de cultivo, a pesar de la doble desinfección con el hipoclorito de sodio en el tratamiento 2. Nuevamente, fue imposible eliminar las bacterias por el protocolo empleado (tabla 5). No se observó efecto tóxico de las NPs-Ag, a la concentración empleada, sobre los segmentos nodales cultivos *in vitro*.

Tabla 5. Efecto de la exposición de los segmentos nodales de sachá inchi (*P. volubilis* L.) a la mezcla de hipoclorito de sodio y NPs-Ag, a los 15 días de cultivo

Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
					Bacterias	Hongos	Total		
*2.5	20	-	-	0	35.0 a	4.5	39.5 a	0	100
2.5	20	2.5	30	0	91.0 b	9.0	100 b	20	80

*300 mg L⁻¹ de NPs-Ag en el medio de cultivo.

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para p<0,05 según la Prueba de proporciones (n=50).

Según informó Parzymies (30) las NPs-Ag proporcionan un área de superficie extremadamente grande, que permitió un mejor contacto con las bacterias, pues las NPs-Ag se adhieren a la membrana celular y penetran fácilmente dentro de las bacterias.

Actualmente, las nanopartículas de plata (NPs-Ag) han demostrado ser efectivas en la inhibición de agentes contaminantes (bacterias y hongos), sin generar resistencia (31, 32, 30), estos resultados constituyen el primer informe, hasta el momento, del uso de NPs-Ag como parte del protocolo de desinfección de segmentos nodales de sachá inchi.

También, Pal *et al.* (33) señalaron que la forma de la nanopartícula también influye en su toxicidad. Se comprobó que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y, por tanto, son más reactivas, y las esféricas son las que presentan menor toxicidad.

Según Manh *et al.* (34) se han utilizado las NPs-Ag para controlar la contaminación por microorganismos, así como para la estimulación del crecimiento. También Kim *et al.* (32) emplearon nanopartículas de plata (NPs-Ag) para controlar la contaminación bacteriana en *Valeriana officinalis*. Por otro lado, Mahna *et al.* se refirieron al efecto del tratamiento con NPs-Ag en la desinfección de la superficie de semillas de *Arabidopsis*, hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) y cotiledones de tomate (*Solanum lycopersicum*). Igualmente, se observó que la adición de NPs-Ag en el medio de cultivo para explantes, de olivo (*Olea europaea*) controló, adecuadamente, los contaminantes internos y no presentó efectos negativos en este como muerte o problemas en el crecimiento.

Multiplicación *in vitro* de sachá inchi

La combinación de los reguladores del crecimiento a las concentraciones evaluadas, con la presencia del floriglucinol (30.0 mg L⁻¹) en el medio de cultivo, permitió alcanzar valores aceptables para la fase de multiplicación *in vitro* de *Plukenetia volubilis* (tabla 6). Es importante destacar que la presencia de este fenol en el medio de cultivo evitó la formación del callo basal en los brotes de sachá inchi, uno de los problemas que se presenta en los protocolos de propagación *in vitro* de especies leñosas y, en específico, en *Plukenetia volubilis* (17).

Tabla 6. Efecto del floriglucinol en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de brotes apicales de plantas *in vitro* de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) obtenidas de semillas inmaduras a los 30 días de cultivo

6 BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Floriglucinol (mg L ⁻¹)	Altura (cm)	Presencia de callo basal (%)	Numero de hojas	Coefficiente de multiplicación
0.5	0.1	0.0	4.6 b	100 b	2.5 a	1.90 b
0.5	0.1	30.0	6.4 a	0.0 a	3.0 a	2.25 a

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey y de proporciones para el caso del porcentaje para $p < 0,05$ ($n=60$).

La mezcla de 0.5 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0.1 mg L⁻¹ de ANA permitió lograr un mayor crecimiento de los brotes, lo que tuvo un efecto positivo en la multiplicación, a partir de las yemas laterales, con un coeficiente de 2.25, para un primer subcultivo, en esta fase de la propagación *in vitro* (figura 3). Al respecto, Solis *et al.* (12) informaron iguales resultados con igual combinación y concentraciones de reguladores del crecimiento, pero con la utilización de meristemos como material inicial.



Figura 3. Brotes *in vitro* de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en medio de cultivo de multiplicación con 30.0 mg L⁻¹ de floriglucinol, sin formación de callo basal, a partir de plantas *in vitro* germinadas de semillas inmaduras, a los 30 días de cultivo.

Al respecto, Bordignon *et al.* (36) refirieron el efecto positivo del 6-BAP en la formación de brotes de sachá inchi y otras especies de la familia *Euphorbiaceae*, tales como *Phyllanthus caroliniensis* Walterb (37). Varios autores también señalaron la combinación de estos dos reguladores del crecimiento para la propagación *in vitro* de sachá inchi vía organogénesis, tanto a partir de semillas como segmentos nodales y yemas apicales (12, 13, 14, 18, 17). Los resultados de la presente investigación apoyan los informados por estos autores.

Varios autores informaron el efecto positivo del floriglucinol en la no formación de callos en la base de los brotes en especies leñosas (38, 39) en la lignificación de los tallos (40) y en la reducción de los procesos de hiperhidricidad (41).

El presente trabajo constituye el primer informe, hasta el momento, de la no formación del callo en la base de los brotes de *Plukenetia volubilis*, al utilizar en el medio de cultivo el regulador del crecimiento floriglucinol, producto de la degradación del floriglucinol y precursor de la ruta de biosíntesis de la lignina, compuesto fenólico relativamente poco utilizado, a pesar de poseer sus propiedades como promotor del crecimiento vegetal (38).

CONCLUSIONES

1. Fue posible alcanzar la germinación *in vitro* de las semillas inmaduras sin testa de sachá inchi en un medio de cultivo con agua de coco, así como un alto porcentaje de segmentos nodales libres de contaminantes, con la presencia de las NPs-Ag en el medio de cultivo.
2. La combinación de los reguladores del crecimiento 6-BAP y ANA, junto con el floriglucinol, permite la multiplicación *in vitro* y sin formación de callo basal, en los brotes apicales obtenidos de plantas de semillas inmaduras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Oilseeds market summary FAO - Trade and Markets Division. [on line]. Mayo de 2021. [Citado mayo de 2022]. URL disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/Food_outlook_oilseeds/Food_Outlook_May_12.pdf. 2022.
2. MADR. Observatorio de competitividad agrocadenas la cadena de oleaginosas aceites y grasas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. 2009.
3. Kodahl, N. Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges. *Planta* 251(4):1-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03377-3>. 2020.
4. Follegatti-Romero, L.; *et al.* Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids* 49: 323–329. 2009.
5. Gutiérrez, L.F.R. Chemical composition of Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites* 62 (1): 76-83. 2011.
6. Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J.Nutr.Biochem.*, 21:781–792. 2010.
7. Hull, M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 25 (4–5): 547-554. 2011.
8. Pascual, G., Mejía, J. Extracción y caracterización de aceite de Sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). *Anales Científicos Universidad Agraria la Molina, Perú*, 25 p. 2000.
9. Dewick, P.M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Second Edition. John Wiley & Song, LTD. England 256 p. 2001.
10. Solis, R.; *et al.* Vegetative propagation of *Plukenetia polyadenia* by cuttings: effects of leaf area and indole-3-butyric acid concentration. *Brazilian Journal of Biology* 77(1): 580–584. 2016.
11. Barrera, O.R. Propagación sexual y clonal de Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo condiciones *in vitro*. Tesis para optar por el Título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú 62p. 2007.
12. Solis, R.; *et al.* *In vitro* propagation of Sachá inchi through organogenesis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53(3):1285–1288. 2018. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2018001100012>.
13. Henao, A.M.R.; Urrea, A.T.; Atehortúa, L.G. Germinación y propagación vegetativa *in vitro* a través del desarrollo de yemas de Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) *Acta Biológica Colombiana* 27(1):70-78. 2021.
14. Restrepo-Osorio, C.; *et al.* Efficient direct shoot organogenesis and genetic stability in micropropagated sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *BMC Research Notes* 13(1):1–7. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05257-1>.
15. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473–497. 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

16. Heinz, D. J.; Mee, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science* 9:346–348. 1969.
17. INIA. Manual práctico de propagación *in vitro* de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), utilizando biorreactores de inmersión temporal. Dirección Regional de Agricultura. Biblioteca Nacional del Perú. 22 p. 2017.
18. Obdulio, B.R Propagación sexual y clonal de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo condiciones *in vitro*. Tesis de Ingeniería para optar el grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú. 62 pp. 2007.
19. Gómez, R. Cultivo de células y tejidos. En: J. Pérez Ponce (Ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Cap. 2. Vol. 1. IBP, Santa Clara. pp. 25-44. 1998.
20. Del Pozo, J.C.; *et al.* Hormonal control of the plant cell cycle. *Plant Physiol.* 123:173-183. 2005.
21. Ovalles, J.F.; *et al.* Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes. Mérida, R. B. de Venezuela* 44: 70-78. 2002.
22. Munro-Olmos D, Ramos-Serrano J, Romero-Cadena A, Figueroa-Viera J. Paquete tecnológico para el cultivo del cocotero en el estado de Colima. Gobierno del estado de Colima, Secretaría de Desarrollo Rural. Estado de Colima. 50 pp. 2005.
23. Taiz I, Zeiger E. *Plant physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 792 p. 1998.
24. Bertolini, V.; *et al.* Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rhynchosstele bictoniensis* (Bateman), en medio de cultivo Knudson C. *Lankesteriana. International Journal on Orchidology*, 13:1-2. 2013. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11623>
25. Soto, A.; Salazar, D. Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rhynchosstele bictoniensis* (Bateman), en medio de cultivo Knudson C. *Universidad de Costa Rica. LANKESTERIANA* 13:1–2. 2013.
26. Guevara, L.; *et al.* Establecimiento *in vitro* del portainjertos híbrido ‘Garfi x Nemared’ para durazno. *Biotecnología Vegetal* 16(2): 73 -82. 2016.
27. Cassells, A.C. Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. En: Loyola-Vargas V, OchoaAlejo N (eds). *Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 877, pp. 57-80. 2012. Humana Press, Totowa. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_6
28. Clavo, E.; *et al.* Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42:298–300. 2007.
29. Janse, J.D. *Phylobacteriology: Principles and Practice*. Wallingford: CABI Publishing. 126 p. 2007.
30. Parzymies, M. Nano-Silver particles reduce contaminations in tissue culture but decrease regeneration rate and slows down growth and development of *Aldrovanda vesiculosa* explants. *Applied Sciences* 11: 36-53. 2021. <https://doi.org/10.3390/app11083653>.
31. Arab, M.M.; *et al.* Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of GN15 (hybrid of almond peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12:103–110. 2014.
32. Kim, D.H.; Gopal, J.; Sivanesan, I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *Royal Society of Chemistry Advance* 7:36492–36505. 2017.
33. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 27: 1712–1720. 2007. doi: 10.1128/AEM.02218-06

34. Manh Cuong, D.; *et al.* Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*—a valuable medicinal plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 146(2):577-588. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02095-2>
35. Mahna, N.; Vahed, S.Z.; Khani, S. Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *J Nanomed Nanotechol* 4:161-172. 2013. doi:10.3389/fpls.2016.01330.
36. Bordignon, S.R.; Bovi-Ambrosano, M.G.; Viegas, R.P.H. *In vitro* propagation of Sacha inchi. *Ciência Rural* 42(7):1168–1172. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000049>
37. Catapan, E.; Otuki, M.F.; Viana, A.M. *In vitro* culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 195-202. 2000. doi: 10.1023/A:1006406806839.
38. Teixeira da Silva, J. A.; Dobránszki, J.; Ross, S. Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 49:1-16. 2013.
39. Posada-Pérez, L.; *et al.* Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja) *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 52:196–203. 2016.
40. Ross, S.; Castillo, A. Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm) DC. en medios de cultivo líquido. *Agrociencia XIV* (1):1-7. 2010.
41. Ross, S.; Grasso, R. *In vitro* propagation of Guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Fruit Veg Cereal Sci Biotech* 4 (special tissue 1): 83-87. 2010.