




**Genética vegetal y biodiversidad**

Artículo de investigación científica y tecnológica

**Micropropagación de caña flecha, *Gynerium sagittatum*  
(Aubl.) P. Beauv. cv. Criolla, Criolla 1 y Martinera, en un  
medio en doble fase**

 Claudia Marcela López Díaz<sup>1</sup>,  Isidro Elías Suárez Padrón<sup>1\*</sup>,

 Alicia Humanez Alvarez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad del Sinú. Montería, Colombia

\* Autor de correspondencia: Instituto de Biotecnología Aplicada para el Caribe, Universidad de Córdoba. Carrera 6 No. 77- 305, bloque 25. Montería, Colombia. [iesuarez@correo.unicordoba.edu.co](mailto:iesuarez@correo.unicordoba.edu.co)

*Editor temático:* Andrés Cortes (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA])

Recibido: 13 de febrero de 2020

Aceptado: 06 de noviembre de 2020

Publicado: 31 de mayo de 2021

*Para citar este artículo:* López Díaz, C. M., Suárez, I. E., & Humanez Alvarez, A. (2021). Micropropagación de caña flecha, *Gynerium sagittatum* (Aubl.) P. Beauv. cv. Criolla, Criolla 1 y Martinera, en un medio en doble fase. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2), e1821. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol22\\_num2\\_art:1821](https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1821)



## Resumen

Con el fin de evaluar la respuesta de la micropropagación de plantas de caña flecha, *Gynerium sagittatum* (Aubl.), en un medio en doble fase durante la etapa de multiplicación, se establecieron explantes (porciones de tallos con meristemos axilares) de los cultivares Criolla, Criolla 1 y Martinera en un medio semisólido *in vitro* y se multiplicaron en un medio en doble fase con adición de varias concentraciones de bencilaminopurina (BAP) (0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L y 2,0 mg/L). Luego, se realizó enraizamiento en un medio con varias concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) (0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L y 2,0 mg/L). Tanto los tallos multiplicados sin enraizar como los enraizados *in vitro* se transfirieron *ex vitro*. Los tratamientos se distribuyeron con un diseño completo al azar, los datos se analizaron con ANOVA y las medias se separaron mediante la prueba de Tukey. Los microbrotes de los genotipos Criolla y Martinera cultivados con 0,5 mg/L de BAP mostraron tasas de multiplicación significativamente superiores en comparación con los controles. Todos los microbrotes multiplicados y transferidos a un medio de enraizamiento formaron raíces, aunque el ANA aumentó significativamente el número de raíces y redujo su longitud. Los tallos multiplicados de los tres cultivares, con raíces o sin raíces, transferidos *ex vitro* mostraron una adaptación y supervivencia del 100 %. Para Criolla y Martinera, los 0,5 mg/L de BAP aumentaron estadísticamente la multiplicación. El ANA incrementó la formación de raíces adventicias y redujo su longitud. Las plantas de todos los cultivares se adaptaron a condiciones *ex vitro* en un 100 %.

**Palabras clave:** caña flecha, doble fase, enraizamiento *in vitro*, medio de cultivo, propagación de plantas

## Micropropagation of arrow cane, *Gynerium sagittatum* (Aubl.) P. Beauv. cv. Criolla, Criolla 1, and Martinera, in a double-phase medium

### Abstract

To evaluate the micropropagation response of arrow cane, *Gynerium sagittatum* (Aubl.), plants using a double-phase medium in the multiplication stage, explants consisting of stem sections with axillary meristems from cultivars Criolla, Criolla 1, and Martinera were established *in vitro* in a semisolid medium. Then, they were multiplied using a double-phase medium supplied at several Benzylaminopurine (BAP) concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg/L), followed by rooting in a culture medium supplied at several Naphthaleneacetic acid (NAA) concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 20 mg/L). Both multiplied unrooted and rooted microshoots were transferred *ex vitro*. Treatments were distributed with a completely randomized design; data were analyzed with an ANOVA and means separated with Tukey's test. Explants from Criolla and Martinera cultured with 0.5 mg/L BAP resulted in higher multiplication rates. All microshoots transferred to the rooting medium rooted, although NAA significantly increased the number of roots and reduced root length. Plants from all three cultivars, *in vitro* rooted or unrooted transferred to *ex vitro* conditions, showed 100 % survival and adaptation. For Criolla and Martinera, 0.5 mg/L BAP statistically increased shoot multiplication rates and NAA increased adventitious root formation and reduced root length. Plants of all cultivars survived and adapted 100 % to *ex vitro* conditions.

**Keywords:** arrow cane, culture media, double phase, *in vitro* rooting, plant propagation

## Introducción

La caña flecha, *Gynerium sagittatum* (Aubl.) P. Beauv. (Poaceae), es la materia prima de muchas artesanías fabricadas por las comunidades indígenas zenú asentadas en los llanos de Córdoba y Sucre, costa norte de Colombia (Pérez, 1978; Uribe, 1982). Las artesanías zenú son reconocidas en el mundo por su belleza y tradición; una de las más populares es el sombrero vueltaio, símbolo cultural colombiano que cuenta con protección comercial por la denominación de origen (Superintendencia de Industria y Comercio [SIC], 2017). Las comunidades aborígenes zenú están organizadas legalmente en el Resguardo Indígena Zenú de San Andrés de Sotavento, con alrededor de 18.000 personas y 5.000 familias que dependen económicamente del trabajo artesanal de la caña flecha (Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2005; Serpa, 2000; Valencia, 1987).

La demanda de productos de caña flecha se ha incrementado en los últimos años debido a una mayor afluencia de turistas y a la venta de artesanías nacionales e internacionales (Artesanías de Colombia, 2019). Dado que no existen cultivos comerciales de caña flecha, la fibra para la fabricación se extrae de las poblaciones de plantas naturales, que han disminuido alrededor del 50 % en los últimos 20 años (Araméndiz et al., 2005). La reducción de las poblaciones naturales no solo afecta de forma negativa a los artesanos al aumentar los costos de la fibra y reducir las ganancias de la venta de productos, sino que también tiene un impacto significativo en los ecosistemas de humedales asociados con la caña flecha (López & Suárez, 2018). El crecimiento radial de las plantas a partir de una sola caña forma un nicho para que muchos insectos, anfibios y otras especies animales completen su ciclo de vida. Además, el sistema de raíces de las plantas es una barrera natural contra la erosión del suelo que preserva el ecosistema (Kalliola et al., 1992). Se requieren alternativas para proveer de fibra natural de caña flecha a la industria artesanal, no solo para preservar el legado artesanal milenario zenú y la tradición cultural colombiana, sino también para reducir el impacto negativo de la actividad de fabricación con caña flecha en el medioambiente.

Diferentes estudios sobre la propagación clonal de la caña flecha han tenido como objetivo producir material vegetal para actividades comerciales de cultivos. En una evaluación de esquejes para clonación posicional, Suárez Padrón (2020) encontró que los esquejes plantados horizontalmente dieron como resultado plantas más enraizadas. La inmersión de la base terminal en tratamientos de auxina (NAA e IBA) (40 mg/L-120 mg/L) aumentó el porcentaje de enraizamiento en esquejes de 40 cm de largo plantados verticalmente (Hernández Murillo et al., 2005). A pesar de los resultados en porcentajes de enraizamiento, la longitud del esqueje necesario para plantar (> 30 cm) hace que la propagación a gran escala sea ineficaz con este método (Hernández Murillo et al., 2005).

La micropropagación es una técnica de propagación clonal que disemina asépticamente plantas *in vitro* en medios de cultivo como sustrato en condiciones ambientales controladas (Cobo et al., 2018; Nunes et al., 2018; Singh et al., 2019; Tisarum et al., 2018). Ante el desafío de producir material vegetal para la siembra comercial de caña flecha (*G. sagittatum*), el Grupo de Investigación en Biotecnología Vegetal (GIBV) de la Universidad de Córdoba ha trabajado para desarrollar un protocolo de micropropagación para la caña flecha Criolla (López & Suárez, 2018; Pastrana & Suárez, 2009; Suárez et al., 2009, 2017). Los esfuerzos ahora se centran en expandir la micropropagación a cultivares distintos a Criolla y reducir

los costos de micropropagación de las plantas para hacer que la producción de caña flecha sea más respetuosa con el medioambiente.

La micropropagación mediante un sistema de medio en doble fase combina el uso de medios semisólidos y líquidos en un solo recipiente para permitir el crecimiento continuo del explante sin subcultivos. En cambio, el suministro de nutrientes se refresca al agregar con regularidad una nueva fase líquida y el estrés tisular se reduce al mantener los cultivos en el mismo receptor hasta la transferencia a la siguiente etapa del protocolo (Schervinski-Pereira et al., 2012). Se espera que esta técnica reduzca los costos al disminuir el uso de agentes gelificantes y permita un mejor crecimiento de las plantas al reducir el número de subcultivos y, por tanto, el estrés de las plantas. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta de micropropagación de tres cultivares de caña flecha en un medio en doble fase durante la etapa de multiplicación.

## Materiales y métodos

### Establecimiento *in vitro*

Se obtuvieron plantas madre de brotes cultivados en el campo de los cultivares Martinera y Criolla 1 del Campo Experimental de la Universidad de Córdoba. Los brotes aislados se lavaron con agua de grifo para eliminar la suciedad y se transfirieron a macetas de plástico (48,5 cm × 60,0 cm) con una mezcla de sustrato de turba y arena (1:1). Las plantas se mantuvieron en un umbráculo con 50 % de luz y riego por aspersión dos veces al día (2 min cada uno). Se roció un tratamiento alternativo semanal con Mancozeb (4 g/L) y Benzimidazol (6 g/L) para prevenir ataques de hongos. Se aislaron los brotes axilares o basales que emergieron de los brotes plantados y se usaron como fuente de explante para el establecimiento *in vitro*. Las hojas y el material de vástago se retiraron de las secciones del tallo (1 cm de diámetro) y se seccionaron a los 3 cm de largo con una sola yema axilar en cada sección. Las porciones se lavaron durante una hora con agua corriente y luego se desinfectaron en la superficie con una solución de hipoclorito de sodio (1,25 % de cloro activo) y dos gotas de Tween 20® durante 20 minutos mientras se agitaban de forma continua.

Posteriormente, las secciones de la planta se lavaron con tres cambios de agua estéril dentro de una campana de flujo laminar. Para evitar la descomposición del explante *in vitro*, los tejidos blanqueados de la parte final de las secciones del explante se retiraron con un bisturí estéril antes del establecimiento *in vitro*. Los explantes, que constan de secciones de tallo de 1-2 cm de largo con una sola yema axilar, se establecieron en matraces de 250 cm<sup>3</sup> que contenían 30 mL del medio semisólido MS (Murashige & Skoog, 1962) con sales principales, mioinositol (100 mg/L), sacarosa (30.000 mg/L), HCl de tiamina (0,4 mg/L) y Phytigel® (4.000 mg/L) (Sigma Co.). Los matraces se cubrieron con dos capas de papel de aluminio resistente y se sellaron con Nescofilm®. Los cultivos se mantuvieron a 20 °C, en un fotoperiodo de 12 horas (40 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-2</sup>), y se transfirieron cada mes a un medio nuevo de la misma formulación. Después de tres subcultivos consecutivos, se registró el número de explantes vivos, explantes con brotes recién formados, explantes contaminados y medios fenolizados.

Los explantes del cultivar Criolla, en cambio, se obtuvieron de plantas establecidas *in vitro* que se mantuvieron en condiciones similares, como se describe para Martinera y Criolla 1, durante un año con transferencias mensuales a un medio fresco. Las plantas originales de Criolla se obtuvieron de ensayos sembrados en el Campo Experimental de la Universidad de Córdoba.

### Multiplicación de brotes

A fin de determinar las mejores condiciones para la multiplicación de brotes a partir de meristemas axilares, grupos compuestos por tres brotes aislados de los cultivares Criolla, Criolla 1 y Martinera establecidos *in vitro* se transfirieron a matraces de borosilicato de 200 cm<sup>3</sup>, los cuales contenían 30 mL del medio MS semisólido con sales principales, y se complementaron con mioinositol (100 mg/L), sacarosa (30.000 mg/L), HCl de tiamina (0,4 mg/L) y agar (8.000 mg/L) (Sigma Co.). Los medios se suministraron de forma independiente a cinco concentraciones de bencilaminopurina (BAP) (0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L y 2,0 mg/L). Los cultivos se cubrieron, se sellaron y se almacenaron como se indica para la etapa de establecimiento.

El experimento consistió en un diseño bifactorial (3 cultivares × 5 niveles de BAP) con 15 tratamientos y cinco repeticiones; se distribuyeron 75 unidades experimentales (recipientes) con un diseño completamente al azar. Cada 20 días se adicionaron a los cultivos 5 mL de medio líquido fresco de la misma formulación —según el tratamiento respectivo— y se almacenaron como se indica en la etapa de establecimiento. Después de agregar el medio por cuarta vez (120 días en cultivo), se registró el número de brotes nuevos por explante y la longitud promedio de los brotes (en cm desde la base hasta la punta de la hoja de los diez brotes de cada tratamiento). Los datos se analizaron mediante un ANOVA basado en el modelo de la ecuación 1, donde  $\mu$  fue la media general,  $T_i$  fue el efecto del cultivar,  $\beta_j$  fue el efecto del nivel de BAP y  $\varepsilon_{iik}$  fue el error experimental. Las medias se separaron mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

$$Y_{ik} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ii} + \varepsilon_{iik}$$

*Ecuación 1*

### Enraizamiento *in vitro*

Para evaluar las condiciones de enraizamiento, los brotes proliferados (racimos de tres brotes) de los cultivares Criolla, Criolla 1 y Martinera se transfirieron a matraces de borosilicato de 200 cm<sup>3</sup> que contenían 30 mL de un medio MS semisólido con sales principales y mioinositol (100 mg/L), sacarosa (30.000 mg/L), HCl de tiamina (0,4 mg/L) y agar (8.000 mg/L) (Sigma Co.). Esto se complementó de forma independiente con cinco concentraciones de NAA (0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L y 2,0 mg/L). Las condiciones de luz, temperatura y fotoperiodo de los cultivos fueron similares, según lo indicado para las etapas de establecimiento y multiplicación. Después de cuatro semanas, se registró el número de cultivos con raíces, el número de raíces por cultivo y la longitud promedio de raíces por cultivo. Los datos recolectados se analizaron con un ANOVA basado en la ecuación 2, donde  $\mu$  fue la

media general,  $T_i$  fue el efecto del cultivar,  $\beta_j$  fue el efecto del nivel de NAA y  $\varepsilon_{ijk}$  fue el error experimental. Las medias se separaron mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

$$Y_{ik} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ii} + \varepsilon_{iik} \quad \text{Ecuación 2}$$

### Aclimatación

Las plantas enraizadas *in vitro* y los brotes sin raíz de la etapa de multiplicación de cada cultivo se transfirieron a condiciones *ex vitro* para evaluar la tasa de supervivencia de la planta. Las plantas micropropagadas se extrajeron de los matraces, se lavaron con agua destilada para eliminar el medio y se colocaron en una bandeja de 72 tapones llena de turba (Pindstrup®) como sustrato. Se colocó una sola planta en cada tapón, se roció con agua destilada y se cubrió la bandeja con una cubierta de plástico transparente. Las bandejas se colocaron en un umbráculo (50 % de luz) y se regaron cada cuatro horas mediante riego vaporizado. Después de tres días, se quitaron las cubiertas y la frecuencia de riego se cambió a una cada ocho horas. Después de 40 días, se registró el número de plantas que sobrevivieron.

## Resultados y discusión

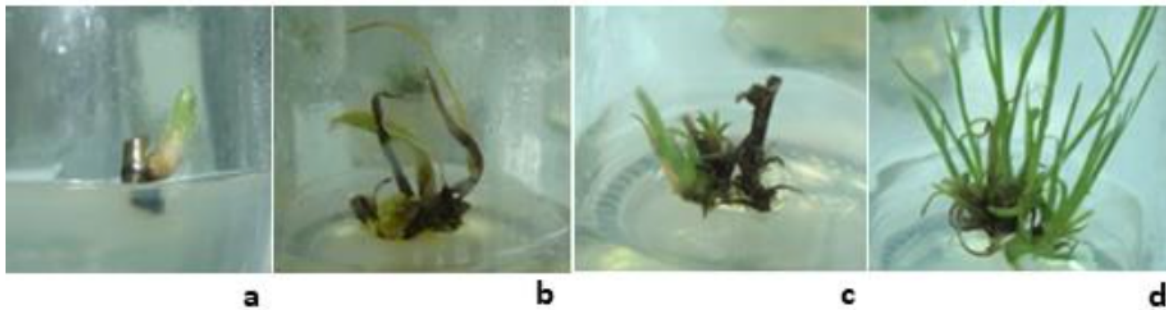
### Establecimiento *in vitro*

La supervivencia del explante en condiciones *in vitro* se vio afectada por la contaminación microbiana, la baja adaptación y la concentración del agente desinfectante. De 120 explantes de cada cultivar establecidos, solo cinco (4,1 %) de Criolla 1 y siete (5,8 %) de Martinera sobrevivieron a condiciones *in vitro*, lo que demuestra el crecimiento de brotes del meristemo axilar. Estos explantes se seleccionaron para trabajos posteriores (tabla 1, figura 1a). Durante las dos primeras semanas, los explantes seleccionados mostraron fugas fenólicas, ennegrecimiento del tejido y descomposición, lo que obligó a transferirlos a un medio nuevo cada tres días durante dos semanas para evitar la muerte del explante (figura 1b). Se observó formación de nuevos brotes en pocos explantes después de cinco semanas (figura 1c). Después de 12-15 semanas, la emisión fenólica se detuvo, los nuevos brotes emergentes y las hojas se acortaron en tamaño, los órganos se volvieron verdes y los brotes nuevos enrojecidos mostraron un patrón de crecimiento radial.

**Tabla 1.** Establecimiento *in vitro* de explantes de caña flecha (*G. sagittatum*) Criolla 1 y Martinera

Cultivar	Explantos totales	Explantos oscurecidos	Explantos contaminados	Explantos sin formación de brotes	Explantos con formación de brotes
<b>Criolla 1</b>	120	120	88	27	5
<b>Martinera</b>	120	120	79	36	7

Fuente: Elaboración propia



**Figura 1.** Proceso de establecimiento *in vitro* de explantes de caña flecha (*G. sagittatum*) en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) semisólido con sales principales. a. Una semana después del establecimiento; b. Dos semanas después del establecimiento; c. Cuatro semanas después del establecimiento; d. Ocho semanas después del establecimiento.

Fotos: Claudia López Díaz

### Multiplicación de brotes

Las plantas multiplicadas *in vitro* mostraron un patrón de crecimiento radial desde un punto central interior hacia la periferia, sin evidencia de crecimiento de brotes adventicios (figura 2).



**Figura 2.** Crecimiento y multiplicación de brotes de caña flecha a partir de explantes con meristemos preexistentes cultivados en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) en doble fase con adición de 0,5 mg/L de BAP después de seis (izquierda) y ocho (derecha) semanas de cultivo en un medio de multiplicación.

Fotos: Claudia López Díaz

El ANOVA permitió detectar que el cultivar, los niveles de BAP y la interacción entre ambos influyeron estadísticamente ( $P < 0,05$ ) en la formación de nuevos brotes. Según la prueba de Tukey, las tasas más altas de formación de nuevos brotes se dieron en los explantes de los cultivares Criolla (28,2), Martinera (21,2) y Criolla 1 (10) (tabla 2) cuando los explantes se cultivaron en un medio con 0,5 mg/L de BAP, aunque para el cultivar Criolla 1 no hubo diferencias estadísticas entre los brotes cultivados en presencia o ausencia de BAP. Las tasas de multiplicación más bajas se presentaron para todos los cultivares cuando los explantes se cultivaron en un medio sin suministro de BAP. El nivel de BAP por encima de  $> 0,5$  mg/L redujo de forma drástica la formación de nuevos brotes (tabla 2, figura 3).

**Tabla 2.** Efecto de BAP sobre la multiplicación de brotes *in vitro* (desviación estándar) y longitud de brotes en cm (desviación estándar) de caña flecha (*G. sagittatum*) cv. Criolla, Criolla 1 y Martinera

BAP (mg/L)	Criolla		Criolla 1		Martinera	
	Número de brote	Longitud de brote (cm)	Número de brote	Longitud de brote (cm)	Número de brote	Longitud de brote (cm)
0,0	5,2 (1,3) <sup>bc</sup>	7,2 (1,7) <sup>bcde</sup>	3,2 (1,3) <sup>c</sup>	8,0 (1,0) <sup>cadbe</sup>	3,4 (0,5) <sup>c</sup>	8,4 (1,8) <sup>cadbe</sup>
0,5	28,2 (2,8) <sup>a</sup>	10,8 (0,8) <sup>a</sup>	10 (1,5) <sup>bc</sup>	9,2 (1,6) <sup>cab</sup>	21,2 (1,0) <sup>a</sup>	9,6 (1,1) <sup>ab</sup>
1,0	11,8 (3,5) <sup>b</sup>	8,0 (1,5) <sup>abcde</sup>	7 (3,3) <sup>bc</sup>	6,4 (1,1) <sup>cfde</sup>	7,6 (1,1) <sup>bc</sup>	5,8 (0,8) <sup>fde</sup>
1,5	10,2 (3,7) <sup>bc</sup>	8,8 (1,3) <sup>abcd</sup>	6,2 (0,8) <sup>bc</sup>	5,9 (1,4) <sup>fde</sup>	5 (1,5) <sup>bc</sup>	7,4 (2,0) <sup>cdbe</sup>
2,0	6,8 (2,1) <sup>bc</sup>	5,5 (1,1) <sup>ef</sup>	7,8 (0,8) <sup>bc</sup>	8,0 (1,8) <sup>cadbe</sup>	3,4 (0,5) <sup>c</sup>	3,8 (0,8) <sup>f</sup>

Fuente: Elaboración propia



**Figura 3.** Multiplicación de brotes de caña flecha (*G. sagittatum*) a partir del explante con meristemas preexistentes de Criolla (izquierda), Criolla 1 (centro) y Martinera (derecha), después de cuatro semanas de cultivo en un medio MS en doble fase con adición de 0,5 mg/L de BAP.

Foto: Claudia López Díaz

Para la longitud de los brotes, el ANOVA permitió detectar diferencias estadísticas ( $Pr < 0,05$ ) entre todos los tratamientos. Los brotes más largos (10,8 cm) crecieron a partir de brotes de Criolla cultivados con 0,5 mg/L de BAP; sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes de los brotes de Criolla 1 y Martinera cultivados al mismo nivel de BAP. Los datos recolectados mostraron una correlación positiva ( $r = 0,78$ ) entre la longitud de los brotes y el nivel de BAP en el medio (figura 3, tabla 2).

#### **Enraizamiento *in vitro***

Los cultivos de todos los cultivares desarrollaron raíces, de manera que se observó un 100 % de enraizamiento para todos los tratamientos; no obstante, el ANOVA permitió detectar diferencias estadísticas ( $Pr < 0,05$ ) entre tratamientos debido a los cultivares, los niveles de NAA y la interacción entre estos dos factores. Los brotes cultivados en medios con adición de NAA desarrollaron un mayor número de raíces que los cultivados en ausencia de NAA. El número de raíces adventicias por explante fue mayor para la mayoría de los cultivares cuando al medio se le añadió 1,0 mg/L de NAA; sin embargo, un nivel de NAA mayor de 1,0 mg/L redujo el número de raíces adventicias (tabla 3, figura 4).

**Tabla 3.** Formación de raíces adventicias *in vitro* (desviación estándar) y longitud de la raíz en cm (desviación estándar) de cultivos de caña flecha (*G. sagittatum*) cv. Criolla, Criolla 1 y Martinera en un medio con adición de NAA

NAA (mg/L)	Criolla		Criolla 1		Martinera	
	Raíces	Longitud de la raíz (cm)	Raíces	Longitud de la raíz (cm)	Raíces	Longitud de la raíz (cm)
0,0	13,2 (8,6) <sup>fde</sup>	3,7 (1,1) <sup>b</sup>	9,2 (4,0) <sup>fe</sup>	6,0 (0,7) <sup>a</sup>	5,2 (0,8) <sup>f</sup>	3,8 (0,9) <sup>b</sup>
0,5	33,0 (3,9) <sup>cab</sup>	1,9 (0,2) <sup>dec</sup>	43,0 (11,2) <sup>a</sup>	2,9 (0,8) <sup>bc</sup>	25,0 (10,7) <sup>cde</sup>	2,7 (1,0) <sup>dbc</sup>
1,0	41,8 (7,0) <sup>ab</sup>	1,5 (0,5) <sup>dec</sup>	42,0 (4,1) <sup>ab</sup>	1,2 (0,2) <sup>e</sup>	46,4 (11,9) <sup>a</sup>	2,0 (0,7) <sup>dec</sup>
1,5	33,4 (6,9) <sup>cab</sup>	1,6 (0,2) <sup>dec</sup>	34,0 (2,9) <sup>cab</sup>	1,6 (0,2) <sup>dec</sup>	26,2 (8,9) <sup>cdb</sup>	1,4 (0,6) <sup>de</sup>
2,0	35,2 (6,3) <sup>cab</sup>	1,5 (0,2) <sup>dec</sup>	34,6 (3,2) <sup>cab</sup>	1,1 (0,2) <sup>e</sup>	36,4 (4,7) <sup>cab</sup>	1,3 (0,4) <sup>de</sup>

Fuente: Elaboración propia



**Figura 4.** Enraizamiento de brotes de caña flecha (*G. sagittatum*) cv. Criolla (izquierda), Criolla 1 (centro) y Martinera (derecha), cultivados *in vitro* después de cuatro semanas de cultivo en un medio MS con adición de 1,0 mg/L de NAA.

Fotos: Claudia López Díaz

La longitud de las raíces adventicias se vio afectada estadísticamente por el suministro de NAA en el medio ( $P_r < 0,05$ ). La prueba de Tukey mostró que las raíces más largas para Criolla 1 (6 cm), Martinera (3,8 cm) y Criolla (3,66 cm) se presentaron en brotes cultivados en un medio sin suministro de NAA; por el contrario, las raíces siempre se acortaron cuando los explantes se cultivaron en un medio con suministro de NAA. Las raíces cultivadas en NAA se redujeron proporcionalmente con una mayor concentración de NAA (figura 4, tabla 3).

### Aclimatación

Las plantas enraizadas *in vitro* de todos los cultivares y los brotes micropropagados de la etapa de multiplicación mostraron una supervivencia completa (100 %) y una adaptación total cuando se transfirieron a condiciones *ex vitro*. Cuatro semanas después de la transferencia, las plantas estaban sanas, presentaban color verde y crecían activamente sin tejidos muertos, áreas necróticas ni crecimiento adventicio (figura 5).



**Figura 5.** Adaptación *ex vitro* de las plantas micropropagadas de caña flecha (*G. sagittatum*) Criolla, Criolla 1 y Martinera.

Fotos: Claudia López Díaz

La micropropagación es una técnica de propagación de plantas clonales que permite producir nuevas plantas a partir de propágulos de pequeño tamaño (explantes) en un entorno aséptico, con condiciones ambientales controladas y crecimiento heterotrófico, entre otras características (Choudhary et al., 2015; Lodha et al., 2015). La micropropagación a partir de explantes con meristemas preexistentes es uno de los métodos de micropropagación más utilizados en la producción de material vegetal comercial debido a su estabilidad genética y fenotípica y a las altas tasas de multiplicación para la mayoría de las especies de plantas (Choudhary et al., 2015; Hassan, 2017).

La micropropagación de meristemas preexistentes se basa en la adición de citoquininas a los medios de cultivo para interrumpir la dominancia apical e inducir la elongación repetitiva de los brotes axilares (Quiroz et al., 2017; Yavuz, 2016). Los datos obtenidos a partir de la presente investigación mostraron que, independientemente del genotipo, la multiplicación de brotes de caña flecha en un sistema de doble fase con 0,5 mg/L de BAP aumentó estadísticamente en los cultivares Criolla y Martinera en comparación con los cultivados en ausencia de BAP. Los informes anteriores sobre la micropropagación de la caña flecha utilizando medios de sistemas semisólidos son consistentes con un aumento de los efectos de BAP en la multiplicación de brotes de meristemas preexistentes (Pastrana & Suárez, 2009; Suárez et al., 2009).

El cultivar Criolla 1 evidenció la tasa de multiplicación más baja (diez nuevos brotes por explante) entre los tres cultivares con esta concentración de BAP. Sin embargo, incluso para este cultivar, la tasa de multiplicación observada, con una frecuencia de cuatro semanas para subcultivos, puede convertirse en un método eficaz de propagación de plantas. Además, dado que la etapa de multiplicación de brotes empleó un medio en doble fase, otros factores deben considerarse provechosos para este protocolo: menores costos en agentes gelificantes, menos mano de obra, menor contaminación del cultivo y menor estrés de la planta. Esto puede resultar en un protocolo de micropropagación más eficiente para plantas de caña flecha (López & Suárez, 2018).

Uno de los propósitos de la multiplicación de brotes a partir de meristemas preexistentes es obtener nuevos brotes que puedan enraizarse de manera eficiente y soportar condiciones *ex vitro* para la adaptación en el campo (Lodha, 2015; Quiroz et al., 2017; Senapati, 2015). El tamaño de los brotes es fundamental en el almacenamiento de reservas de energía para la formación de raíces adventicias y el

desarrollo de nuevos órganos cuando se transfieren a condiciones *ex vitro* (Kane, 1996; Suárez Padrón, 2020). Los brotes multiplicados de caña flecha en un sistema de medio convencional semisólido con 0,5 mg/L de BAP midieron en promedio 3 cm de largo (Pastrana & Suárez, 2009), mientras que, en la presente investigación, los brotes con el mismo suministro de BAP fueron tres veces más grandes (9 cm). Se observaron resultados similares al comparar brotes de piña *Ananas comosus* L. (Bromeliaceae) (Scherwinski-Pereira et al., 2012) y de caña flecha *G. sagittatum* (López & Suárez, 2018; Suárez-Padrón et al., 2020) cultivados en medios semisólidos y en medios bifásicos. El aumento del tamaño de los brotes se asocia con una mayor acumulación de reservas de energía, lo que genera más posibilidades de supervivencia cuando se transfieren a condiciones *ex vitro* y un mejor desempeño de la planta durante la fase inicial de crecimiento y desarrollo en el campo (Almeida do Vale et al., 2019; Espinosa-Reyes et al., 2019).

La raíz es el órgano que permite la absorción de agua y nutrientes y estabiliza la planta en el sustrato (Quiroz et al., 2017; Senapati, 2015). En condiciones *in vitro*, el medio vegetal y el medio ambiente evitan la deshidratación del tejido vegetal y favorecen la absorción de nutrientes sin formación de raíces. No obstante, para condiciones *ex vitro*, el enraizamiento *in vitro* proporciona los mecanismos para el crecimiento y desarrollo normales de la planta en condiciones de campo abierto (Choudhary et al., 2017; Zakavi et al., 2016). Por lo general, la formación de raíces adventicias *in vitro* se promueve mediante el suministro de auxinas en el medio de cultivo (Ozdemir et al., 2014; Resende et al., 2016). La presente investigación mostró que el suministro de NAA en el medio aumentó estadísticamente la inducción de la formación de raíces adventicias en los brotes de caña flecha micropropagados para todos los cultivares. Los brotes cultivados en un medio con adición de NAA formaron tres veces más raíces que los cultivados en ausencia de NAA; la respuesta aumentó incluso en comparación con estudios previos de enraizamiento *in vitro* con caña flecha (Pastrana & Suárez, 2009; Suárez et al., 2009).

El enraizamiento *in vitro* de buena calidad no solo se relaciona con la formación y proliferación de raíces adventicias, sino también con características de la raíz como la longitud y el ancho (Benavides et al., 2016; Rodríguez et al., 2015; Zakavi et al., 2016). Durante la transferencia a condiciones *ex vitro*, los brotes con raíces más cortas son fáciles de manipular y no requieren recorte, lo que produce estrés y heridas abiertas (Kane, 1996). Las raíces formadas en medios con suministro de NAA fueron un 50 % más cortas que las cultivadas en medios privados de NAA, lo que redujo la longitud de la raíz a medida que aumentaron los niveles de NAA para todos los cultivares, un patrón que parece ser similar para la mayoría de las especies de plantas cultivadas *in vitro*.

La cuarta etapa de la micropropagación está destinada a brindar a las plantas micropropagadas las condiciones ambientales óptimas para resistir la transición de un modelo de crecimiento heterótrofo (*in vitro*) a uno autótrofo (*ex vitro*) (Ozdemir et al., 2014; White et al., 2016). La baja competencia fotosintética es uno de los factores limitantes más severos para que las plantas cultivadas *in vitro* de forma convencional se adapten a las condiciones externas del campo. Los cultivos *in vitro* no son activamente fotosintéticos, ya que la intensidad de la luz no puede activar la función del cloroplasto en condiciones normales *in vitro*; por lo tanto, se debe agregar sacarosa al medio de cultivo como fuente de energía (Seon et al., 2000; Tisarum et al., 2018). La disfunción del cloroplasto permanece cuando las plantas se transfieren a condiciones *ex vitro* y es necesaria la formación de nuevos órganos, específicamente hojas, para activar la fotosíntesis y la nutrición autótrofa. Dado que no se producen

carbohidratos u otra fuente energética, la energía requerida para la formación de nuevos órganos proviene de las reservas acumuladas durante el crecimiento *in vitro* (Lata et al., 2016; Nunes et al., 2016). El presente estudio mostró que los brotes cultivados en doble fase eran tres veces más grandes que los micropropagados en sistemas de medios semisólidos convencionales informados en otros estudios (Pastrana & Suárez, 2009; Suárez Padrón, 2020), lo que aumenta su capacidad para la formación de nuevos órganos y su habilidad para desempeñarse mejor durante la transición *in vitro-ex vitro*.

Un segundo factor limitante para las plantas cultivadas *in vitro* transferidas a condiciones *ex vitro* es la deshidratación rápida y severa de los tejidos (Kumari et al., 2017; Mozafari et al., 2015). Las plantas *in vitro* se mantienen en una atmósfera cerrada saturada de agua y se establecen en un medio de cultivo con > 90 % de agua. Este ambiente totalmente húmedo evita la activación de mecanismos como el cierre de estomas y la acumulación de cutículas, destinadas a evitar la deshidratación. Como la estructura foliar *in vitro* es propensa a una rápida deshidratación cuando se transfiere a *ex vitro*, las plantas deben colocarse en un ambiente con alta saturación de agua (sistemas de riego vaporizado) y baja intensidad de luz (umbráculo), con el fin de evitar la pérdida de plantas (Bukhari et al., 2016; Zakavi et al., 2016). En la presente investigación, independientemente del cultivar y de la etapa de micropropagación (multiplicación de brotes o enraizamiento *in vitro*), los cultivos transferidos a condiciones *ex vitro* se adaptaron por completo y sobrevivieron (100 % de supervivencia), como se informó en estudios previos (Pastrana & Suárez, 2009; Suárez et al., 2009).

La etapa de enraizamiento *in vitro* es la más costosa del protocolo de micropropagación debido a los gastos de auxina, la mano de obra, las cantidades de medio de cultivo y los reactivos. Por otra parte, la transferencia de la etapa de multiplicación a la de enraizamiento aumenta el riesgo de contaminación, el estrés de los tejidos y el tiempo de cultivo. La transferencia directa de brotes de la etapa de multiplicación a la adaptación *ex vitro* reduce los costos y el tiempo, a la vez que mantiene las tasas de supervivencia y la calidad de la planta. El desempeño de los brotes enraizados y no enraizados cuando se transfieren a condiciones *ex vitro* demostró que el enraizamiento *in vitro* es innecesario para que las plantas micropropagadas se adapten a las condiciones *ex vitro*, lo que indica que la transferencia *ex vitro* desde la etapa de multiplicación se puede realizar sin implicaciones para la supervivencia de la planta. En cambio, es posible acortar el tiempo para la producción de la planta y reducir los costos.

El presente protocolo para la micropropagación de la caña flecha Criolla, Criolla 1 y Martinera, utilizando un medio en doble fase y la transferencia de brotes directamente desde la etapa de multiplicación a la adaptación *ex vitro*, permite la producción en masa de plantas de alta calidad a partir de pocos explantes establecidos *in vitro* en un periodo relativamente corto.

## Conclusiones

Menos del 10 % de los cultivares Criolla 1 y Martinera se adaptaron a condiciones *in vitro*. Un suministro de 0,5 mg/L de BAP en el medio aumentó estadísticamente las tasas de multiplicación de brotes para Criolla y Martinera. El suministro de NAA en el medio aumentó la formación de raíces adventicias y redujo la longitud de las raíces para todos los brotes de cultivares; sin embargo, no afectó los porcentajes de enraizamiento. Los brotes micropropagados de todos los cultivares mostraron

adaptación y supervivencia completas (100 %) cuando se transfirieron a condiciones *ex vitro*, ya fueran enraizadas *in vitro* o no.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad de Córdoba y a la Universidad del Sinú por el apoyo brindado durante la investigación. También agradecen la colaboración de Juana Robles en la orientación estadística y de Carmen Polo Tordecilla en el trabajo de laboratorio.

## Descargos de responsabilidad

Todos los autores hicieron contribuciones significativas al documento, acordaron publicarlo y declararon no tener ningún conflicto de intereses en este estudio.

## Referencias

- Almeida do Vale, P., Oliveira, J., Da Silva, F., & Scherwinski-Pereira, J. (2019). Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during pre-acclimatization. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49, e53751. <http://doi.org/10.1590/1983-40632019v4953751>
- Araméndiz, H., Espitia, M., & Robles, J. (2005). *Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (Gynerium sagittatum Aubl.) del Caribe colombiano*. Universidad de Córdoba.
- Artesanías de Colombia. (2019). *Materias primas. Caña flecha*. [https://www.artesaniadescolombia.com.co/PortalAC/C\\_sector/cana-flecha\\_183](https://www.artesaniadescolombia.com.co/PortalAC/C_sector/cana-flecha_183)
- Benavides, T., Córdova, A., & Vaca, I. (2016). Propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. para la obtención de plantas completas. *La Granja: Revista Ciencias de la Vida*, 24(2), 150-158. <http://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.12>
- Bukhari, N., Siddique, I., & Perveen, K. (2016). Preculturing effect of thidiazuron on *in vitro* shoot multiplication and micropropagation round in *Capparis decidua* (Forsk.) an important multipurpose plant. *Acta Biologica Hungarica*, 67(3), 297-304. <http://doi.org/10.1556/018.67.2016.3.7>
- Cobo, M., Sepúlveda, B., & Torres, M. (2018). Regeneration of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) plants through axillary bud culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 54, 112-116. <http://doi.org/10.1007/s11627-018-9884-3>
- Choudhary, R., Chaudhury, R., Malik, S. K., & Sharma, K. C. (2015). An efficient regeneration and rapid micropropagation protocol for almond using dormant axillary buds as explants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(7), 462-467. <http://hdl.handle.net/123456789/31741>
- Choudhary, S., Patel, A., Harish, S., Shekhawat, S., & Shekhawat, N. (2017). An improved micropropagation system, *ex vitro* rooting and validation of genetic homogeneity in wild female *Momordica dioica*: an underutilized nutraceutical vegetable crop. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23, 713-722. <http://doi.org/10.1007/s12298-017-0441-z>

- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2005). *Censo general 2005*. <http://www.dane.gov.co/censo/files/libroCenso2005nacional.pdf>
- Espinosa-Reyes, A., Silva-Pupo, J., Bahi-Arevich, M., & Romero-Cabrera, D. (2019). Influence of *in vitro* plant size and substrate type on the acclimatization of *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), 23-29. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=2081>
- Hassan, M. (2017). Improvement of *in vitro* date palm plantlet acclimatization rate with kinetin and Hoagland solution. En J. Al-Khayri, S. Jain, & D. Johnson (Eds.), *Date palm biotechnology protocols volume I. Methods in molecular biology* (vol. 1637, pp. 185-200). Humana Press. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5\\_16](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_16)
- Hernández Murillo, J., Aramendiz Tatis, H., & Cardona Ayala, C. (2005). Influencia del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Temas Agrarios*, 10(1), 5-13. <http://doi.org/10.21897/rta.v10i1.626>
- Kane, M. (1996). Micropropagation from pre-existing meristems. En R. Trigiano & D. Gray (Eds.), *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises* (pp. 75-86). CRC Press.
- Kalliola, R., Puhakka, M., & Salo, J. (1992). Interspecific variation, and the distribution and ecology of *Gynerium sagittatum* (Poaceae) in the western Amazon. *Flora*, 186(3-4), 153-167. [http://doi.org/10.1016/s0367-2530\(17\)30531-5](http://doi.org/10.1016/s0367-2530(17)30531-5)
- Kumari, K., Lal, M., & Saxena, S. (2017). Enhanced micropropagation and tiller formation in sugarcane through pretreatment of explants with thidiazuron (TDZ). *3 Biotech*, 7, 282. <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0910-7>
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I., & ElSohly, M. (2016). *In vitro* propagation of *Cannabis sativa* L. and evaluation of regenerated plants for genetic fidelity and cannabinoids content for quality assurance. En S. Jain (Ed.), *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. Methods in molecular biology* (vol. 1391, pp. 275-288). Humana Press. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7\\_19](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_19)
- Lodha, D., Patel, A., & Shekhawat, N. (2015). A high-frequency *in vitro* multiplication, micromorphological studies and *ex vitro* rooting of *Cadaba fruticosa* (L.) Druce (Bahuguni): a multipurpose endangered medicinal shrub. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21, 407-415. <http://doi.org/10.1007/s12298-015-0310-6>
- López, C., & Suárez, I. (2018). *In vitro* arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) multiplication in double phase medium. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 3(2), 5-13. <http://doi.org/10.22267/rcia.183502.86>
- Mozafari, A., Vafae, Y., & Karami, E. (2015). *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromatica* Maroofi —an indigenous threatened medicinal plant of Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21, 433-439. <http://doi.org/10.1007/s12298-015-0313-3>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nunes, S., Santos, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Oliveira, H., Ferreira, J., Pereira, V., Almeida, T., Marum, L., & Dias, M. (2016). Physiological characterization and true-to-typeness evaluation of *in vitro* and *ex vitro* seedlings of *Pinus elliottii*: a contribution to breeding programs. *Plant Physiology Biochemistry*, 107, 222-227. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.039>

- Nunes, S., Sousa, D., Pereira, V., Correia, S., Marum, L., Santos, C., & Dias, M. (2018). Efficient protocol for *in vitro* mass micropropagation of slash pine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 54, 175-183. <http://doi.org/10.1007/s11627-018-9891-4>
- Ozdemir, F., Yildirim, M., & Pourall, M. (2014). Efficient micropropagation of highly economic, medicinal and ornamental plant *Lallemantia iberica* (Bieb.) Fisch. and C. A., Mey. *BioMed Research International*, 2014, 476346. <http://doi.org/10.1155/2014/476346>
- Pastrana, I., & Suárez, I. (2009). Producción de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) “Criolla” a través de micropropagación. *Temas Agrarios*, 14(2), 2-18. <https://doi.org/10.21897/rta.v14i2.671>
- Pérez, A. (1978). *Plantas útiles de Colombia*. Editora Arco. Quiroz, K., Berrios, M., Carrasco, B., Retamales, J., Caligari, P., & García-González, R. (2017). Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* L. Duch.). *Biological Research*, 50, 20. <http://doi.org/10.1186/s40659-017-0125-8>
- Resende, C., Braga, V., Pereira, P., Silva, C., Vale, V., Bianchetti, R., Forzza, R. C., Ribeiro, C., & Peixoto, P. H. (2016). Proline levels, oxidative metabolism and photosynthetic pigments during *in vitro* growth and acclimatization of *Pitcairnia enbolirioides* L.B. Sm. (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 76(1), 218-227. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.19314>
- Rodríguez, M., Carrillo, R., Chacón, M., Hormazábal, N., Tampe, J., & Tighe, R. (2015). Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile. *Gayana Botánica*, 721(72), 14-20. <http://doi.org/10.4067/s0717-66432015000100002>
- Scherwinski-Pereira, J., Araruna, E., Da Silva, T., Gomes, A., Maciel, S., & Da Silva, F. (2012). Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109, 263-269. <http://doi.org/10.1007/s11240-011-0091-8>
- Senapati, S. K. (2015). A double phase culture system: an economic and time saving protocol for *in vitro* propagation of plant. *Scholarena*, 2(1), 1-5. <http://doi.org/10.18875/2375-6713.1.301>
- Serpa, R. (2000). *Los zenúes*. Secretaría de Cultura de Córdoba.
- Seon, J., Cui, Y., Kozai, T., & Paek, K. (2000). Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rebmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 135. <http://doi.org/10.1023/A:1006473223286>
- Singh, R., Anandhan, S., García-Pérez, L., Ruiz-May, E., Nava, E., & Quiroz-Figueroa, F. (2019). An efficient protocol for *in vitro* propagation of the wild legume *Cicer microphyllum* Benth. a crop wild relative of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55, 9-14. <http://doi.org/10.1007/s11627-018-09958-y>
- Suárez, I., Araméndiz, H., & Pastrana, I. (2009). Micropropagación de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(2), 5135-5143. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24925>
- Suárez, I., Ortiz, O., & López, C. (2017). Formación *in vitro* de rizomas en caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) y recuperación de plantas. *Temas Agrarios*, 22(1), 9-18. <http://doi.org/10.21897/rta.v22i1.911>
- Suárez-Padrón, I., Pérez-Abdala, C., & López-Díaz, C. (2020). Micropropagación de *Gynerium sagittatum* Aubl. cvs “Criolla”, “Costera” y “Martinera”. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 18(2), 60-69. [http://doi.org/10.18684/bsaa\(18\)60-69](http://doi.org/10.18684/bsaa(18)60-69)

- Suárez Padrón, I. (2020). *Cultivos de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
- Superintendencia de Industria y Comercio. [SIC]. (2017). *Informe de gestión vigencia 2017*. <https://www.sic.gov.co/sites/default/files/documentos/012018/INFORME-GESTION-SIC-2017.pdf>
- Tisarum, R., Samphumphung, T., Theerawitaya, C., Prommee, W., & Cha-Um, S. (2018). *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and *ex vitro* adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133, 215-223. <http://doi.org/10.1007/s11240-017-1374-5>
- Uribe, J. (1982). *Flora sonsonera o colección de monografías familiares de vegetales selectos indígenas o cultivados en el municipio de Sonsón*. Concejo Municipal de Sonsón.
- Valencia, G. (1987). *Córdoba. Su gente, su folclor*. Publicaciones Casa de la Cultura.
- White, S., Adelberg, J., Naylor-Adelberg, J., Mann, D., Song, J., & Sun, Y. (2016). Micropropagation, acclimatization, and greenhouse culture of *Veratrum californicum*. En S. Jain (Ed.), *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. Methods in molecular biology* (vol. 1391, pp. 187-199). Humana Press. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7\\_13](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_13)
- Yavuz, D. (2016). Optimization of regeneration conditions and *in vitro* propagation of *Sideritis stricta* Boiss & Heldr. *International Journal of Biological Macromolecules*, 90, 59-62. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.064>
- Zakavi, M., Askari, H., & Irvani, N. (2016). Optimizing micropropagation of drought resistant *Pyrus boissieriana* Buhse. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22, 583-593. <http://doi.org/10.1007/s12298-016-0387-6>