

Evaluación de fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para la propagación *in vitro* de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) a partir de meristemos

Ana Graciela Arévalo Ayala

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para la propagación *in vitro* de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) a partir de meristemos

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Ana Graciela Arévalo Ayala

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Evaluación de fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para la propagación *in vitro* de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) a partir de meristemos

Ana Graciela Arévalo Ayala

Resumen. La albahaca se considera una fuente importante de aceites esenciales y compuestos aromáticos, la cual puede usarse para fines culinarios, medicinales o como ornamental fragante. La micropropagación se ha convertido en una herramienta importante para la producción masiva de plántulas. El objetivo de este estudio fue evaluar fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de meristemos de albahaca cultivares Genovesa y Red Rubin. En el establecimiento se utilizaron meristemos axilares y apicales en medio Murashige y Skoog modificado y suplementado con reguladores de crecimiento. Se evaluaron los tratamientos BAP (Bencilaminopurina) (1.14 mg/L de BAP), BAP + AG (Ácido giberélico) (1.0 mg/L de BAP + 0.4 mg/L de AG) y TDZ (Thidiazurón) (11 mg/L de TDZ los primeros 12 días, después medio MS sin hormonas). Después de 42 días en los medios de establecimiento, se transfirieron a los medios de multiplicación, suplementados con BAP + AIA (Ácido Indolacético) (0.56 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de AIA), BAP (0.3 mg/L de BAP) y sin reguladores de crecimiento. En la etapa de establecimiento los resultados demostraron que el tratamiento 1.14 BAP y 1.0 BAP + 0.4 AG fueron los mejores en producción de hojas. En la etapa de multiplicación para ambas variedades, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el número de brotes por explante. Los mejores tratamientos en la etapa de establecimiento son los suplementados con BAP. En la etapa de multiplicación no es necesario usar fitohormonas en el medio de cultivo.

Palabras clave: Citoquininas, hiperhidratación, meristemos axilares y apicales.

Abstract. Basil is considered an important source of essential oils and aromatic compounds, which can be used for culinary, medicinal or fragrant ornamental purposes. The micropropagation of basil has become an important tool for the massive production of seedlings. The aim of this study was to evaluate phytohormones supplemented to the culture medium for the *in vitro* establishment and multiplication of cultivars Genovesa and Red Rubin basil meristems. Axillary and apical meristems were used in the establishment in Murashige and Skoog modified medium and supplemented with growth regulators. The treatments BAP (Benzyladenine) (1.14 mg / L BAP), BAP + AG (Gibberellic acid) (1.0 mg/L BAP + 0.4 mg/L AG) and TDZ (Thidiazuron) (11 mg/L TDZ the first 12 days, then MS medium without hormones). After 42 days in the establishment media, the shoots were transferred to the multiplication media supplemented with BAP + AIA (0.56 mg/L BAP + 0.1 mg/L AIA), BAP (0.3 mg/L BAP) and without growth regulators. At the establishment stage the results showed that treatment 1.14 BAP and 1.0 BAP + 0.4 AG were the best in terms of leaf production. In the multiplication stage for both varieties, no significant differences between treatments were found for the number of shoots per explant. Therefore, the best treatments in the establishment stage are those supplemented with BAP and in the multiplication stage the use of hormones is indifferent between treatments in the formation of micro cuttings.

Key words: Axillary and apical meristems, cytokinins, hyperhydration.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. METODOLOGÍA.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4. CONCLUSIONES.....	11
5. RECOMENDACIONES.....	13
6. LITERATURA CITADA	14

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).....	4
2. Reguladores de crecimiento suplementados al medio MS para el establecimiento <i>in vitro</i> de albahaca.....	5
3. Reguladores de crecimiento suplementados al medio MS para la multiplicación <i>in vitro</i> de albahaca.....	5
4. Número de hojas y brotes en respuesta a los tratamientos para el establecimiento <i>in vitro</i> de albahaca cultivar Red Rubin.	7
5. Número de brotes por esqueje en respuesta a los tratamientos en multiplicación <i>in vitro</i> de albahaca cultivar Red Rubin subcultivo 1 y 2.....	8
6. Número de hojas y brotes en respuesta a los tratamientos para el establecimiento <i>in vitro</i> de albahaca cultivar Genovesa.....	10
7. Número de brotes por esqueje en respuesta a los tratamientos en multiplicación <i>in vitro</i> de albahaca cultivar Genovesa subcultivo 1 y 2.....	11
Figuras	Página
1. Formación de brotes en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de albahaca cultivar Red Rubin. A. Tratamiento 1.14 BAP; B. Tratamiento 1.0 BAP + 0.4 AG; C. Tratamiento 11 TDZ.....	7
2. Plántulas de de albahaca cultivar Red Rubin en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> A. Tratamiento 0.56 BAP + 0.1 AIA, B. Tratamiento sin reguladores.	8
3. Plántulas de albahaca cultivar Genovesa en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> . A Tratamiento 1.14 BAP; B. Tratamiento 1.0 BAP + 0.4 AG; C. Tratamiento 11 TDZ.	9
4. Formación de hojas y tallos en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de albahaca Genovesa. A. Tratamiento 0.56 BAP + 0.1 AIA, B. Tratamiento 0.3 BAP, C. Tratamiento sin reguladores. En la imagen B y C se puede observar las plantas hiperhidratadas	10

1. INTRODUCCIÓN

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta herbácea anual, que pertenece a la familia Lamiaceae (Labiatae) originaria de Asia y África. Se cultiva principalmente por sus hojas aromáticas, que se utilizan frescas o se secan para la destilación del aceite esencial o para condimento (Charles 2013). Hay más de 50 especies de albahaca. Estas difieren en hábito de crecimiento, apariencia fisiológica, composición química y aromática (DAFF 2012).

Comercialmente hay tres tipos principales de albahaca que se usan para aceite esencial u hojas secas como producto final: la albahaca francesa, la cual se conoce por tener el sabor más dulce y más oscuro en color, la albahaca americana, considerada de alta calidad por su color y sabor dulce y la albahaca egipcia también conocida por su fragancia y sabor. Debido a las múltiples propiedades que posee la albahaca, su uso es variado y de gran amplitud. Se considera una planta medicinal aromática, por lo que el nivel de importancia como acompañante alimenticio y como uso medicinal para aliviar problemas digestivos, es significativo (Charles 2013).

Esta hierba se considera una fuente importante de aceites esenciales y compuestos aromáticos, una hierba culinaria y también como ornamental fragante. La obtención de aceites es partir de las semillas. Los extractos de la planta se usan en medicinas tradicionales y se ha demostrado que contienen componentes biológicamente activos que son insecticidas, nematocidas, fungistáticos y antimicrobianos (Kintzios y Makri 2008). Los cultivares seleccionados que se pueden cultivar a partir de semillas incluyen la albahaca dulce (Genovesa, de hoja grande), albahaca morada (Opal oscuro, Volantes morado), albahaca limón. La albahaca se cultiva mejor en zonas subtropicales. La temperatura óptima para la germinación es de 20 °C, y para un óptimo crecimiento temperaturas de 7 a 27 °C (DAFF 2012).

El método convencional para la propagación de albahaca es a través de semillas y estacas. Sin embargo, debido al pobre potencial de germinación restringe la multiplicación (Sahoo et al 1997). Por lo que la propagación *in vitro* es un medio eficaz para multiplicar rápidamente las especies en que los métodos convencionales tienen limitaciones. Se han investigado diferentes protocolos para la propagación *in vitro* de albahaca de los cuales se han obtenido resultados satisfactorios. Sahoo et al. (1997) demostraron que para la inducción de brotes a través de explantes nodales se puede utilizar el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG).

Otro estudio, realizado por Siddique y Anis (2008), demostró que una propagación eficiente se obtenía a través de segmentos nodales con brotes axilares. Y para la inducción de los brotes el medio MS suplementado con BAP fue óptimo.

El objetivo de este estudio fue:

- Evaluar fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de meristemas de albahaca cultivares Genovesa y Red Rubin.

2. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, ubicado en el Departamento de Ciencia Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Material vegetal.

Se utilizaron meristemos axilares y apicales de albahaca de los cultivares Genovesa y Red Rubin que se cultivan en el módulo de Agricultura Orgánica ubicado en Zamorano. Se eliminaron todas las hojas y los tallos se separaron en segmentos nodales, para así facilitar la extracción de los meristemos ubicados en las axilas.

Desinfección del material vegetal. La desinfección de los segmentos nodales, previo a la extracción del explante, consistió en un lavado con jabón líquido seguido por una inmersión en cloro comercial (NaClO 4.72% ingrediente activo) a una concentración del 5% v/v al cual se le agregó dos gotas de Tween[®] 80 por cada 100 mL de la solución. Los segmentos nodales se sumergieron en dicha solución por 5 minutos y luego se hicieron tres lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Medios de cultivo.

En este estudio se evaluaron fitohormonas en la etapa de establecimiento y multiplicación, las cuales fueron suplementadas al medio de cultivo. Los medios evaluados estuvieron compuestos en su totalidad por el medio de Murashige y Skoog (MS) completo (Cuadro 1) y suplementado con 6-Bencilaminopurina (BAP), Ácido Giberélico (AG), Thidiazurón (TDZ) y Ácido Indolacético (AIA) según la etapa de micropropagación y el tratamiento a evaluar. A todos los medios se les agregó el biocida PPM (Plant Preservative Mixture) (1 mL/L) y el pH se ajustó a 5.8. Los medios fueron solidificados con Phytigel (1.8 g/L) y esterilizados a 121 °C, 15 PSI por 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemos de albahaca (*Ocimum basilicum*).

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Tiamina	0.400
		Ácido Nicotínico	0.500
		Piridoxina	0.500
		Myo-Inositol	100.000
Carbohidratos		Sacarosa	30,000.000

Fuente: (Kyte 1987)

Establecimiento de meristemos de albahaca.

Los tratamientos evaluados en la etapa de establecimiento fueron tres: 1.14 mg/L de BAP, 1 mg/L de BAP + 0.4 mg/L de AG y 11 mg/L de TDZ durante 12 días, después de este tiempo, se transfirió a un medio sin hormonas (Cuadro 2). El día 21 después del establecimiento se realizó un refrescamiento de medio, lo cual consistió en transferir los explantes a medio fresco, que contenía las mismas hormonas, según tratamiento

Cuadro 2. Reguladores de crecimiento suplementados al medio MS para el establecimiento *in vitro* de albahaca.

Tratamientos [¥] (mg/L)	Autores
1.14 BAP	Siddique y Anis (2008)
1.0 BAP + 0.4 AG	Sahoo et al. (1997)
11 TDZ los primeros 12 días. después medio MS sin hormonas	Siddique y Anis (2007)

[¥] BAP: Bencilaminopurina, AG: Ácido Giberélico, TDZ: Thidiazurón

Multiplicación *in vitro* de albahaca.

A los 42 días del establecimiento de los meristemos, ya había formación de brotes y de tejido callogénico por lo que se procedió a transferir dichos brotes a medios para su multiplicación. Los medios para multiplicación a los que se transfirieron los brotes fueron basados en el Murashige y Skoog (MS) completo (Cuadro 1) y suplementados con reguladores según el tratamiento evaluado.

Los tratamientos evaluados en la etapa de multiplicación fueron tres: 0.56 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de AIA, 0.3 mg/L de BAP y sin reguladores (Cuadro 3). Después de 21 días de la transferencia de los vitrosquejes a los medios de multiplicación, se separaron los brotes formados y transfirieron (subcultivaron) a otros frascos para facilitar su desarrollo, se realizaron dos subcultivos.

Cuadro 3. Reguladores de crecimiento suplementados al medio MS para la multiplicación *in vitro* de albahaca.

Tratamientos [¥] (mg/L)	Autores
0.56 BAP + 0.1 AIA	Siddique y Anis (2008)
0.3 BAP	Sahoo et al. (1997)
Sin regulador	Siddique y Anis (2007)

[¥] BAP: Bencilaminopurina, AIA: Ácido Indolacético

Incubación.

Los explantes establecidos y los brotes multiplicados se incubaron a un ambiente controlado con una temperatura de 24 °C, 70% humedad relativa, una intensidad lumínica de 2 klx y 16 horas luz.

Variables evaluadas.

En la etapa de establecimiento se evaluó a los 21 días el número de hojas, a los 42 días el número de brotes y porcentaje de plantas hiperhidratadas. En la etapa de multiplicación se evaluó el número de brotes por micro esqueje al día 21 de cada subcultivo.

Diseño experimental.

Se evaluó cada cultivar como un experimento independiente. Para los dos cultivares se usó el diseño completo al azar con tres tratamientos y 40 repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza y separación de medias por el método de Duncan, con probabilidad ≤ 0.05 . Los datos obtenidos en la etapa de multiplicación del cultivar Red Rubin fueron analizados mediante la prueba t de Student. Se usó el Sistema de Análisis Estadístico (SAS[®] versión 9).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Albahaca cultivar Red Rubin.

Establecimiento. La formación de tejido callogénico se observó a partir del día cinco después del establecimiento. A partir del día 10 se observó la formación de hojas en algunos explantes (Figura 1). Respecto al número de hojas y brotes no hubo diferencias entre tratamientos (Cuadro 4). Este resultado no concuerda con la investigación anteriormente realizada por Siddique y Anis (2008), donde BAP fue más efectiva que otras citoquininas en la formación de las plántulas.

Cuadro 4. Número de hojas y brotes por esqueje en respuesta a los tratamientos para el establecimiento *in vitro* de albahaca cultivar Red Rubin.

Tratamiento [¥] (mg/L)	Hojas		Brotes
	21 días	42 días	42 días
1.14 BAP	2.7 ns	4.4 ns	1.2 ns
1.0 BAP + 0.4 AG	2.0	4.1	1.3
11 TDZ	1.1	3.1	1.1
Prueba F	2.86	1.39	0.52
CV	62.75	45.98	38.52
Grados de libertad	27	38	44
Probabilidad	0.0759	0.2625	0.5957

[¥] BAP: Bencilaminopurina, AG: Ácido Giberélico, TDZ: Thidiazurón

ns: no se encontró diferencias significativas

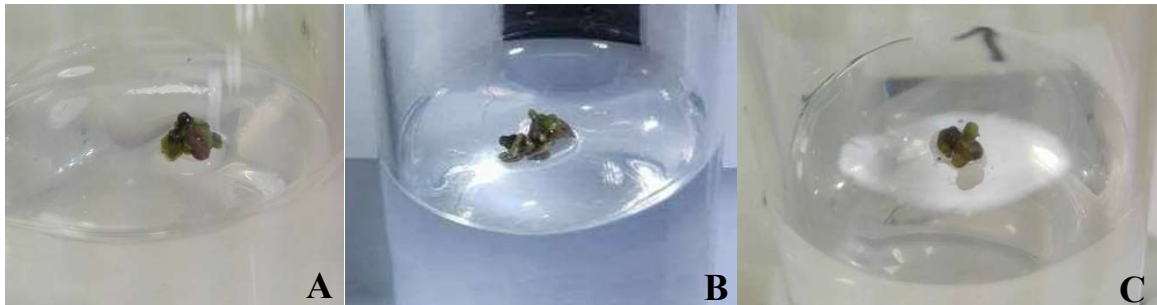


Figura 1. Formación de brotes en la etapa de establecimiento *in vitro* de albahaca cultivar Red Rubin. A. Tratamiento 1.14 BAP (Bencilaminopurina); B. Tratamiento 1.0 BAP + 0.4 AG (Ácido Giberélico); C. Tratamiento 11 TDZ (Thidiazurón).

Multiplicación. En cuanto al número de brotes por esqueje no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 5), sin embargo en esta etapa las plántulas que se encontraban en el tratamiento 0.3 BAP, no sobrevivieron posiblemente porque los explantes requieren la presencia de esta hormona a concentraciones mayores. Los datos obtenidos concuerdan con la investigación realizada por Siddique y Anis (2007) en el cual los mejores resultados se obtuvieron cuando los brotes inducidos de diferentes tratamientos de TDZ se subcultivaron tres veces a un medio MS libre de hormonas para su multiplicación. También concuerdan con los resultados de Siddique y Anis (2008) en los cuales entre todas las combinaciones de citoquininas-auxina ensayadas, la obtención de mayor número de brotes por explante se obtuvo con la suplementación de BAP con AIA. Por lo que ambos tratamientos son viables para la obtención de mayor número de brotes por esqueje (Figura 2).

Cuadro 5. Número de brotes por esqueje en respuesta a los tratamientos en multiplicación *in vitro* de albahaca cultivar Red Rubin subcultivo 1 y 2.

Tratamientos †(mg/L)	Subcultivo 1	Subcultivo 2
	21 días	42 días
0.56 BAP + 0.1 AIA	1.9 ns	1.4 ns
Sin regulador	3.0	2.0
Prueba F	4.8	2.719
Valor t	1.4	1.2
Grados de libertad	18	18
Probabilidad	0.05	0.05

† BAP: Bencilaminopurina, AIA: Ácido Indolacético

ns: no se encontraron diferencias significativas



Figura 2. Plántulas de albahaca cultivar Red Rubin en la etapa de multiplicación *in vitro* A. Tratamiento 0.56 BAP (Bencilaminopurina) + 0.1 AIA (Ácido Indolacético), B. Tratamiento sin reguladores.

Albahaca cultivar Genovesa.

Establecimiento. En la formación de brotes no se presentaron diferencias significativas en cuanto a los tratamientos (Cuadro 6). El desarrollo de las plantas de albahaca Genovesa fue satisfactorio debido a un mayor número y tamaño de hojas (Figura 3) y la presencia de tallos elongados.

Esta variedad presentó alto porcentaje de plantas hiperhidratadas pero esto no se debió a los tratamientos. La hiperhidratación, llamada también vitrificación, es un desorden fisiológico que se caracteriza por la apariencia morfológica anormal en tejidos y órganos cultivados *in vitro*, especialmente en hojas que presentan una apariencia translúcida, húmeda y vidriosa (Debergh et al.1992). Entre las principales causas de la hiperhidratación están el potencial osmótico y la concentración de gelificante en el medio de cultivo (Cárdenas y Villegas 2002) o al mal funcionamiento de estomas y defectos en la constitución de la pared celular y cutícula de las células de la epidermis (González 2015).

En cuanto al número de hojas por tratamiento, sí hubo diferencias significativas. Las plantas que se encontraban en los tratamientos 1.14 BAP y 1.0 BAP + 0.4 AG desarrollaron más cantidad de hojas que las plantas que se encontraban en el tratamiento 11 TDZ. El resultado del tratamiento 1.14 BAP concuerda con investigaciones anteriores realizadas por Siddique y Anis (2008), donde BAP fue más efectiva que otras citoquininas en la formación de las plántulas y en cuanto al tratamiento 1.0 BAP + 0.4 AG concuerda con las investigaciones realizadas por Sahoo et al. (1997), quienes indicaban que AG a una concentración óptima suplementada con BAP incrementa notablemente la inducción más rápida de brotes.

Cuadro 6. Número de hojas y brotes en respuesta a los tratamientos para el establecimiento *in vitro* de albahaca cultivar Genovesa.

Tratamientos [‡] (mg/L)	Hojas		Brotes
	21 días	42 días	42 días
1.14 BAP	3.1 a ^β	10.6 ab	1.4 ns
1.0 BAP + 0.4 AG	4.1 a	13.8 a	1.1
11 TDZ	0.8 b	8.3 b	1.1
Prueba F	4.59	3.45	6.88
CV	51.09	51.62	26.27
Grados de libertad	29	39	29
Probabilidad	0.0193	0.0421	0.0038

[‡]BAP: Bencilaminopurina, AG: Ácido Giberélico, TDZ: Thidiazurón

^β Los números seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$)

ns: no se encontraron diferencias significativas

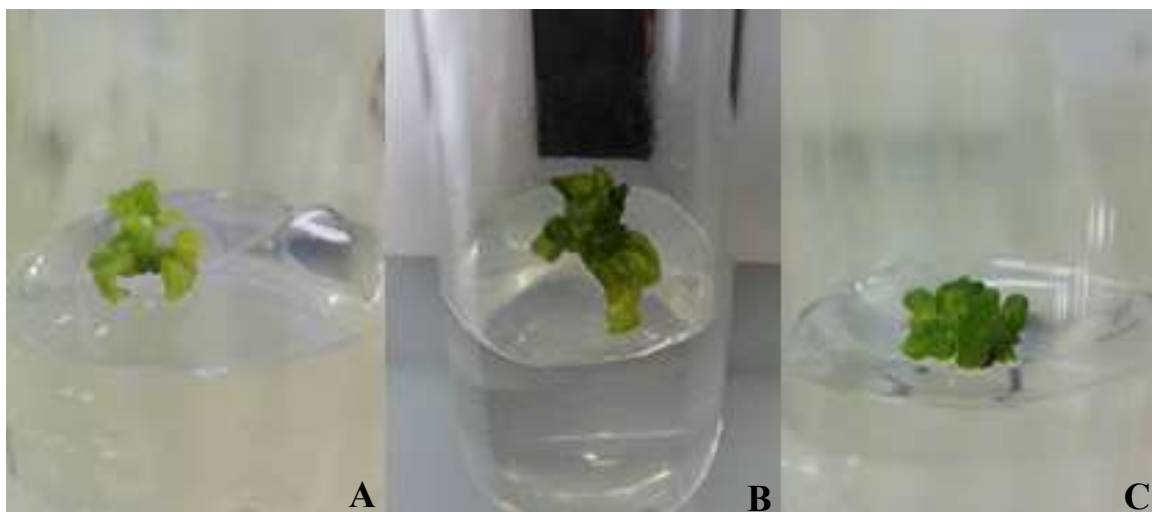


Figura 3. Formación de brotes y hojas en la etapa de establecimiento *in vitro* de albahaca cultivar Genovesa. A Tratamiento 1.14 BAP (Bencilaminopurina); B. Tratamiento 1.0 BAP + 0.4 AG (Ácido Giberélico); C. Tratamiento 11 TDZ (Thidiazurón).

Multiplicación. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos (Cuadro 7). Las plantas que habían mostrado hiperhidratación en la etapa de establecimiento, en la etapa de multiplicación siguieron presentando dicho desorden fisiológico (Figura 4).

Cuadro 7. Número de brotes por esqueje en respuesta a los tratamientos en multiplicación *in vitro* de albahaca cultivar Genovesa subcultivo 1 y 2.

Tratamientos [¥] (mg/L)	Subcultivo 1	Subcultivo 2
	21 días	42 días
0.56 BAP + 0.1 AIA	2.5 ns	2.5 ns
0.3 BAP	2.7	4.5
Sin reguladores	2.7	4.6
Prueba F	1.18	2.02
CV	64.34	68.69
Grados de libertad	29	28
Probabilidad	0.3233	0.1528

[¥] BAP: Bencilaminopurina, AIA: Ácido Indolacético

ns: no se encontró diferencias significativas

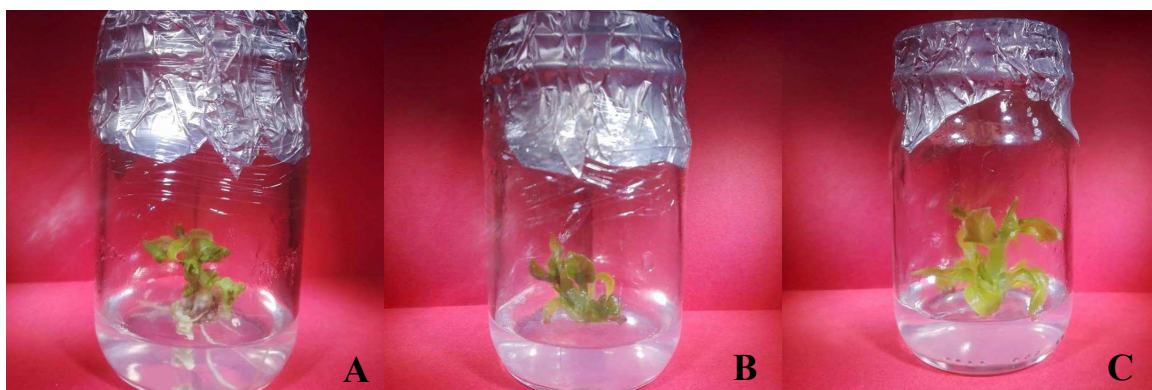


Figura 4. Plántulas de albahaca cultivar Genovesa en la etapa de multiplicación *in vitro*. A. Tratamiento 0.56 BAP (Bencilaminopurina) + 0.1 AIA (Ácido Indolacético), B. Tratamiento 0.3 BAP, C. Tratamiento sin reguladores. En la imagen B y C se puede observar las plantas hiperhidratadas.

4. CONCLUSIONES

- Los tratamientos en la etapa de establecimiento suplementados con BAP dan como resultado mayor número de hojas y brotes para el cultivar Genovesa. En el cultivar Red Rubin el uso de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Thidiazurón (TDZ) no afecta el número de hojas y brotes.
- En la etapa de multiplicación no es necesario el uso de fitohormonas en el medio de cultivo para la formación de micro esquejes.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio en las etapas de enraizamiento y aclimatación.
- Estudiar qué factores son los que podrían reducir la hiperhidratación en las plantas en el cultivar Genovesa.

6. LITERATURA CITADA

- Cárdenas Lara MA, Villegas Monter A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (2): 213-217.
- Charles DJ. 2013. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York (United States of America): Springer; [consultado 2017 jun 09]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4614-4310-0.pdf>
- DAFF (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2012. Basil production. [internet]. Pretoria: Directorate Communication Services; [consultado 2017 jun 12]. <http://www.nda.agric.za/docs/Brochures/ProGuiBasil.pdf>
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Arnold S, Zimmerman R, Ziv M. 1992. Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation Journal of plant Biotechnology. 30(2): 135-140. eng doi: 10.1007/BF00034307
- González Cruz J. 2015. Micropropagación mediante cultivo *in vitro*, aplicaciones. Universidad Santo Tomás. [consultado 2017 sep 17]. <https://es.slideshare.net/cristalsalcedofalcon/cultivo-in-vitro-45975868>
- Kintzios S, Makri O. 2008. *Ocimum sp.* (Basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. J Herbs Spices Med Plants. 23(3): 123-150. eng. doi: 10.1300/J044v13n03_10
- Kyte L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micropropagation. 3a ed. Portland, Oregon: Colorcraft. 239 p.
- Sahoo Y, Patfnaik SK, Chand PK. 1997. *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *in vitro* Cell. Dev. Biol. -Plant 33(4): 293-296. eng doi: 10.1007/s11627-997-0053-3
- Siddique I, Anis M. 2007. Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. *Biologia Plantarum* 51(4): 787-790. eng doi: 10.1007/s10535-007-0161
- Siddique I, Anis M. 2008. An improved plant regeneration system and *ex vitro* acclimatization of *Ocimum basilicum* L. *Acta Physiol Plant* 30:493–499. eng. doi: 10.1007/s11738-008-0146-6