

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Propagación *in vitro* de albahaca morada (*Ocimum basilicum* L.)
variedad Red Rubin a partir de segmentos nodales**

Estudiante

Jeniffer Edith Pilaquina Llulluna

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Alejandra Sierra Augustinus, M.Sc.

Honduras, julio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	4
Índice de Figuras	5
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Materiales y Métodos	10
Material Vegetal.....	10
Desinfección del Material Vegetal	10
Experimento 1. Efecto de los Reguladores de Crecimiento AIA y BAP	11
Experimento 2. Efecto del Gelificante en la Hiperhidratación	11
Incubación.....	12
Variables Evaluadas	12
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	13
Resultados y Discusión.....	14
Experimento 1. Efecto de Reguladores de Crecimiento AIA y BAP	14
Experimento 2. Efecto del Gelificante en la Hiperhidratación	18
Conclusiones	21
Recomendaciones.....	22
Referencias.....	23

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de albahaca variedad Red Rubin (<i>Ocimum basilicum</i> L.).....	12
Cuadro 2 Número de hojas por explante de albahaca variedad Red Rubin a los 76 días en establecimiento <i>in vitro</i>	15
Cuadro 3 Porcentaje de vitro plantas hiperhidratadas de albahaca variedad Red Rubin en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> en respuesta a Phytigel™ y Agar.....	18
Cuadro 4 Número de raíces y brotes por explante de albahaca variedad Red Rubin en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a Phytigel™ y Agar.....	18
Cuadro 5 Número de hojas por explante de albahaca variedad Red Rubin en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> en respuesta a Phytigel™ y Agar.....	19

Índice de Figuras

Figura 1 Preparación del material (A) Recolección del material vegetal; (B) Eliminación de hojas; (C) Separación en segmentos nodales.	10
Figura 2 Explantes contaminados de segmentos nodales de albahaca. (A) Bacteria; (B) Hongos. Día 5	14
Figura 3 Crecimiento de hojas a partir de segmentos nodales establecidos in vitro. Día 15	15
Figura 4 Establecimiento in vitro de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento 0.5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina) + 0.01 de AIA (Ácido Indolacético). (A) Día 5; (B) Día 21; (C) Día 76	16
Figura 5 Establecimiento in vitro de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento 0.5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina). (A) Día 5; (B) Día 21; (C) Día 76.....	17
Figura 6 Establecimiento in vitro de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento Testigo. (A) Día 5; (B) Día 21; Día (C) 76.....	17
Figura 7 Explantes vitrificados de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento (A) 0.5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina) + 0.01 de AIA (Ácido Indolacético); Tratamiento (B) 0.5 mg/L de BAP; Tratamiento (C) Testigo	17
Figura 8 Establecimiento de segmentos nodales in vitro de albahaca variedad Red Rubin usando Phytigel™ 1.8 g/L como gelificante. (A) Día 21; (B) Día 42.....	20
Figura 9 Establecimiento de segmentos nodales in vitro de albahaca variedad Red Rubin usando Agar 5 g/L como gelificante. (A) Día 21; (B) Día 42	20
Figura 10 Vitro plantas de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento (A) Phytigel™ 1.8 g/L; (B) Agar 5 g/L al cabo de 42 días sin refrescamiento del medio de cultivo.....	20

Resumen

La albahaca es una planta multipropósito de gran importancia económica y etnobotánica con propiedades insecticidas, nematocidas y fungistáticas. La propagación *in vitro* es una alternativa para la propagación de plantas a gran escala en menor tiempo dentro de un ambiente controlado obteniendo mejores resultados. El estudio fue dividido en dos experimentos, el objetivo del primer experimento fue evaluar el efecto de BAP (6-Bencilaminopurina) y AIA (Ácido Indolacético) en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de albahaca morada variedad Red Rubin y en el segundo experimento se evaluó la influencia del gelificante en la hiperhidratación de vitro plantas. Se utilizaron segmentos nodales establecidos en el medio Murashige y Skoog suplementado con reguladores de crecimiento. Se evaluaron los tratamientos 0.5 mg/L BAP y 0.01 mg/L AIA + 0.5 mg/L BAP, los gelificantes utilizados fueron Agar 5 g/L y Phytigel™ 1.8 g/L. Los resultados demostraron que el uso de AIA y BAP no presentan diferencias en el número de hojas, raíces o brotes. La hiperhidratación en esta variedad se presentó luego de 42 días sin refrescamiento de medio en el tratamiento que contenía Phytigel™ como gelificante.

Palabras clave: Citocininas, auxinas, hiperhidratación, segmentos nodales

Abstract

Basil is a multipurpose plant of great economic and ethnobotanical importance with insecticidal, nematicidal and fungistatic properties. In vitro propagation is an alternative for the propagation of plants on a large scale in less time within a controlled environment obtaining better results. The study divided into two experiments, the objective of the first experiment was to evaluate the effect of BAP (6-Benzylaminopurine) and IAA (Indoleacetic Acid) in the in vitro establishment of nodal segments of red rubin variety red basil and in the second experiment evaluated the influence of the gelling agent on the hyperhydration of vitro plants. Nodal segments established in Murashige and Skoog medium supplemented with growth regulators used. The treatments 0.5 mg / L BAP and 0.01 mg / L IAA + 0.5 mg / L BAP were evaluated, the gelling agents used were Agar 5 g / L and Phytigel™ 1.8 g / L. The results showed that the use of IAA and BAP did not show differences in the number of leaves, roots or shoots. Hyperhydration in this variety occurred after 42 days without medium cooling in the treatment containing Phytigel™ as gelling agent.

Keywords: Cytokinins, auxins, hyperhydration, nodal segments

Introducción

Las plantas son una parte fundamental para el desarrollo y evolución de la humanidad, en sus inicios fueron utilizadas como alimento y con el paso del tiempo se convirtieron en la base para nuevos experimentos en diferentes áreas de investigación de las que sobresale la medicina. Sin embargo, el uso excesivo de muchas especies ha ocasionado un desequilibrio en la naturaleza, provocando que ciertas especies se encuentren amenazadas o al borde de la extinción. En los últimos años el interés por el desarrollo de nuevas técnicas que proporcionen una rápida propagación de las plantas ha crecido de manera significativa, es allí donde aparece la propagación *in vitro* como alternativa para la multiplicación y conservación de plantas a gran escala, evitando los problemas generados en una propagación convencional.

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.), es una planta multipropósitos de gran importancia económica y etnobotánica perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Originaria de la India y extendiéndose por Asia, África y América Central y Sudamérica, con más de 50 especies (DAFF 2012). Esta se cultiva principalmente por los compuestos aromáticos que sus hojas poseen, mismos que son utilizados en la medicina, la fabricación de perfumes o gastronomía (Charles 2013). Además, posee compuestos fenólicos con propiedades insecticidas, nematocidas, fungistáticas y antimicrobianas (Cardoso Ugarte y Sosa Morales 2012).

La albahaca se cultiva de manera tradicional a través de semillas y esquejes. Sin embargo, las semillas presentan problemas de germinación y viabilidad, lo que restringe su multiplicación y a su vez la progenie presenta variabilidad a causa de la polinización cruzada (Saha et al. 2012). Los métodos convencionales presentan limitaciones en la propagación de ciertas especies, es por ello que la propagación *in vitro*, representa una alternativa eficaz en la multiplicación de especies, en un ambiente controlado obteniendo un alto porcentaje en la uniformidad de la progenie.

Sahoo et al. (1997) demostraron que era posible la inducción de brotes de albahaca dulce a través de explantes nodales utilizando el medio de Murashige y Skoog suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG). Otro estudio realizado por Dode et al. (2003) demostró la eficiencia de BAP y Ácido 1-naftalenacético (ANA) durante la etapa de establecimiento de albahaca, obteniendo como resultado un incremento en el número de brotes por explante. Siddique y Anis (2008) por su parte demostraron que BAP fue más efectiva que otras citocininas en la formación de plántulas de albahaca dulce.

Los objetivos del estudio fueron evaluar el efecto de BAP (6-Bencilaminopurina) y AIA (Ácido Indolacético) en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin; y evaluar el efecto del gelificante en la hiperhidratación de vitro plantas albahaca variedad Red Rubin.

Materiales y Métodos

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

Material Vegetal

Se utilizaron segmentos nodales, de albahaca variedad Red Rubin (*Ocimum basilicum* L.) (Figura 1), estos se extrajeron de plantas cultivadas dentro de una estructura de malla en el módulo de Agricultura Orgánica de Zamorano. El material vegetal se extrajo el 8 de diciembre del año 2020 para el experimento 1, y el 24 de febrero del año 2021 para el experimento 2.

Desinfección del Material Vegetal

Se eliminaron todas las hojas de los esquejes cuidando de no dañar los meristemas axilares, luego se separaron en segmentos nodales (Figura 1). La desinfección consistió en un lavado con jabón líquido y agua potable, 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 fueron sumergidos en dicha solución durante 5 minutos, luego se realizó tres lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Figura 1

Preparación del material (A) Recolección del material vegetal; (B) Eliminación de hojas; (C)

Separación en segmentos nodales.



Experimento 1. Efecto de los Reguladores de Crecimiento AIA y BAP

Los esquejes se extrajeron el 8 de diciembre del año 2020, cuando finalizaba la estación lluviosa en Honduras. Los segmentos nodales fueron establecidos en el medio de Murashige y Skoog (MS) completo (Cuadro 1) y suplementado con Ácido Indolacético (AIA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) según el tratamiento a evaluar. El pH se ajustó a 5.8. Los medios fueron solidificados con Phytigel™ (1.8 g/L) y esterilizados a 121 °C, 1 Kg/cm² por 20 minutos. El refrescamiento de medio de cultivo se realizó al cabo del día 76 de establecidos los explantes in vitro debido a las restricciones de acceso al laboratorio por la pandemia.

Los tratamientos evaluados fueron tres:

- Testigo sin reguladores de crecimiento
- 0.5 mg/L de BAP
- 0.5 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de AIA

Experimento 2. Efecto del Gelificante en la Hiperhidratación

Los esquejes se extrajeron el 24 de febrero del año 2021, cuando iniciaba la estación seca en Honduras. Los segmentos nodales fueron establecidos en el medio de Murashige y Skoog (MS) completo (Cuadro 1) sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5.8. Los medios fueron solidificados según el tratamiento a evaluar y esterilizados a 121 °C, 1 Kg/cm² por 20 minutos. Se realizó un refrescamiento de medio de cultivo cada 21 días hasta el día 42, luego de ello las vitro plantas permanecieron 42 días sin refrescamiento de medio de cultivo.

Los tratamientos evaluados fueron dos:

- Phytigel™ 1.8 g/L
- Agar 5 g/L

Cuadro 1

Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento y multiplicación in vitro de albahaca variedad Red Rubin (Ocimum basilicum L.)

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
Micro elementos	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 .2HO	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Vitaminas	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
		Inositol	100.000
		Tiamina	0.100
		Piridoxina	0.500
Carbohidratos		Ácido Nicotínico	0.500
		Sacarosa	30000.000

Nota: Fuente: (CIAT 1991)

Incubación

Los explantes se incubaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 °C, 50% de humedad relativa, PAR (radiación fotosintéticamente activa) 40 μmol/m²/segundo con luz fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad.

Variables Evaluadas

En la etapa de establecimiento se evaluó el porcentaje de contaminación determinado de manera visual observando la presencia de micelios (hongos) o exudados de apariencia lechosa (bacterias). También se contó el número de hojas, raíces y brotes a los 21, 42, 76 y 84 días según el experimento. Adicionalmente, se contó el número de plantas hiperhidratadas a los 42, 76 y 84 días según el experimento.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para el Experimento 1 se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA) evaluando tres tratamientos con 50 repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza y separación de medias por el método de Duncan, con probabilidad ≤ 0.05 .

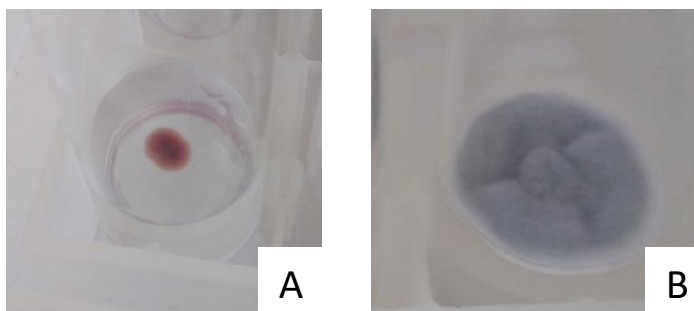
Para el Experimento 2 se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA) evaluando dos tratamientos con 100 repeticiones por tratamiento. Se realizó la prueba t de Student para muestras independientes.

Resultados y Discusión

La contaminación en segmentos nodales se observó a partir del día cinco luego de ser establecidos *in vitro*, se identificó micelios sobre los segmentos y bacterias alrededor del explante (Figura 2).

Figura 2

Explantes contaminados de segmentos nodales de albahaca. (A) Bacteria; (B) Hongos. Día 5

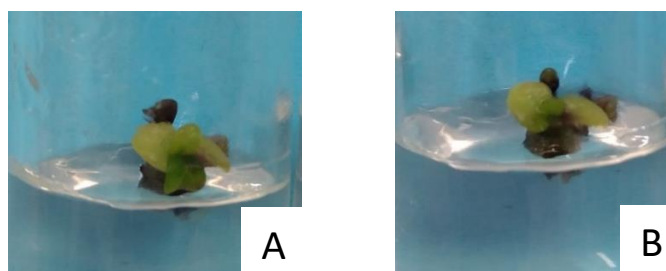


Experimento 1. Efecto de Reguladores de Crecimiento AIA y BAP

Los esquejes se extrajeron el 8 de diciembre del 2020, cuando estaba finalizando la estación lluviosa en Zamorano. La formación de tejido callogénico se pudo observar a partir del día cinco de establecidos los explantes. Para el día 15 se observó el crecimiento de hojas en la mayoría de explantes (Figura 3). En cuanto al número de hojas, no se observó diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 2). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Arévalo Ayala (2017) donde el uso de 6-Bencilaminopurina (BAP) no afecta el número de hojas y brotes.

Figura 3

Crecimiento de hojas a partir de segmentos nodales establecidos in vitro. Día 15

**Cuadro 2**

Número de hojas por explante de albahaca variedad Red Rubin a los 76 días en establecimiento in vitro

Tratamiento (mg/L)	Hojas
Testigo	6.86 ns
0.5 BAP ¥	6.75
0.5 BAP + 0.01 AIA	8.17
CV	20.49
Probabilidad	0.05

Nota: ¥ BAP: Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; ns: no hay diferencias significativas ($P > 0.05$)

Al cabo de 76 días los explantes presentaron hiperhidratación en todos los tratamientos evaluados (Figuras 4, 5 y 6). La hiperhidratación, también conocida como vitrificación, es un desorden morfo-fisiológico frecuentemente observado en las vitro plantas, donde éstas adquieren una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida. Este desorden afecta en los procesos de fotosíntesis y el intercambio gaseoso afectando el desarrollo de la vitro planta y su proceso de aclimatación (Figura 7). Este desorden es el resultado de varias alteraciones en determinadas rutas metabólicas debido a factores como elementos minerales, carbohidratos y elevadas dosis de reguladores de crecimiento, una baja intensidad lumínica en el proceso de incubación y la muy alta humedad relativa del ambiente en el que se desarrollan las vitro plantas (López Encina 1996). Por su parte Olmos et al. (2010) mencionan que este fenómeno está regulado por la humedad relativa y el

potencial de agua que afecta la fotosíntesis y transpiración factores principales dentro de este proceso.

La hiperhidratación es un problema asociado a la propagación *in vitro* de una gran cantidad de especies. Es un fenómeno complejo en el que se ven involucrados diversos factores, entre ellos el uso de citocininas que en ocasiones pueden inducir la aparición de la hiperhidratación (Casas Cendoya y Lasa Dolhagaray 1986). Por otro lado, Villegas y Cárdenas (2002) mencionan la principal causa de la hiperhidratación es el potencial osmótico y la concentración de gelificante en el medio de cultivo.

Según Chacón et al. (2000) la manera de reducir los síntomas de hiperhidratación es con una mayor concentración de gelificante dentro del medio de cultivo. El cultivar plantas en sistemas estáticos como el que usamos en este experimento, aumenta la frecuencia de este desorden, ya que las *in vitro* plantas están dentro de un contenedor sellado, con muy poco intercambio gaseoso y pérdida de humedad. Por lo que Etienne y Berthouly (2002) mencionan el uso de sistemas de inmersión temporal para evitar la hiperhidratación en plantas cultivadas *in vitro* y observaron que es favorable usar tiempos cortos y frecuencias espaciadas de inmersión, puesto que el contacto continuo de los tejidos con el medio de cultivo es una fuente de hiperhidratación.

Figura 4

Establecimiento in vitro de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento 0.5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina) + 0.01 de AIA (Ácido Indolacético). (A) Día 5; (B) Día 21; (C) Día

76

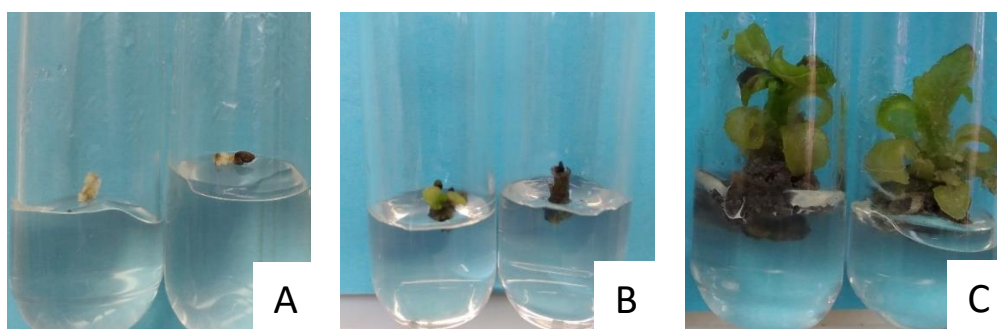
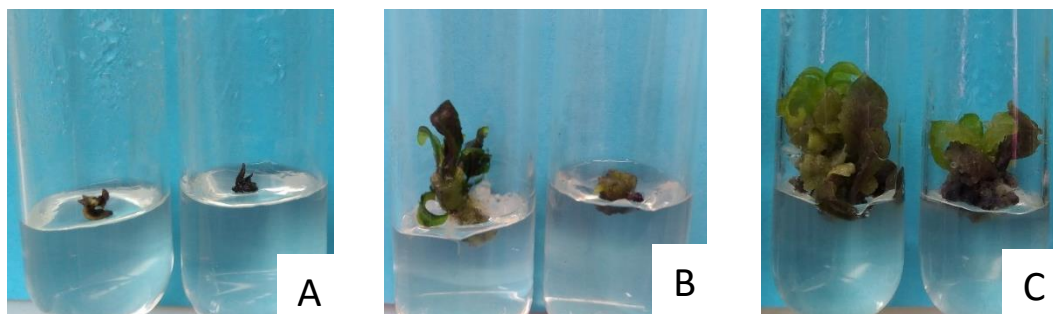
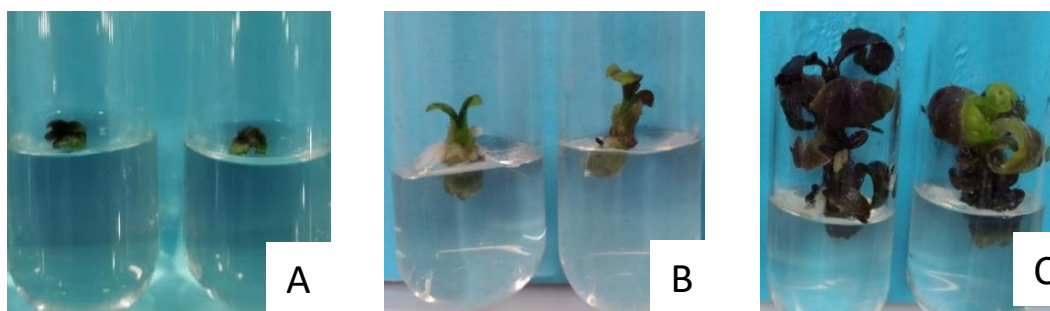


Figura 5

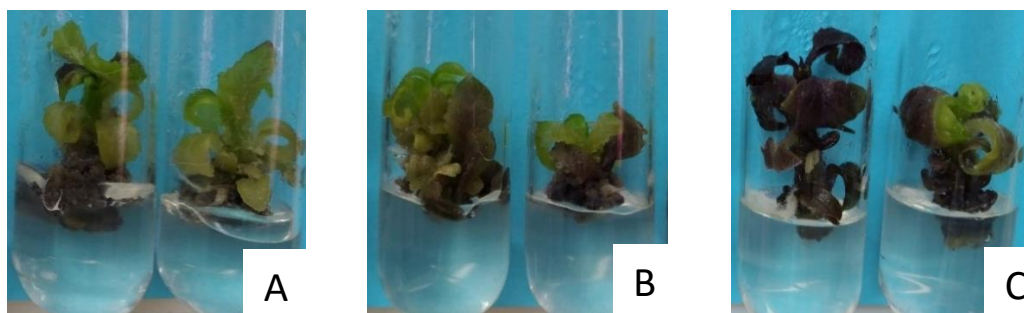
Establecimiento in vitro de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento 0.5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina). (A) Día 5; (B) Día 21; (C) Día 76

**Figura 6**

Establecimiento in vitro de segmentos nodales de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento Testigo. (A) Día 5; (B) Día 21; Día (C) 76

**Figura 7**

Explantes vitrificados de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento (A) 0.5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina) + 0.01 de AIA (Ácido Indolacético); Tratamiento (B) 0.5 mg/L de BAP; Tratamiento (C) Testigo



Experimento 2. Efecto del Gelificante en la Hiperhidratación

En este experimento se realizaron refrescamientos de medio a los 21 y 42 días logrando un desarrollo favorable, no se observó hiperhidratación en ningún tratamiento (Figura 8 y 9), por lo que se descarta que la causa de este desorden es el gelificante. Es posible que la causa sea el tiempo que pasa la vitro planta en el medio sin ser refrescado, puesto durante el primer experimento no se realizó ningún refrescamiento de medio.

Para comprobar lo planteado anteriormente, los explantes se mantuvieron 42 días en el mismo medio (sin refrescamiento), tiempo en el cual los explantes que se encontraban en Phytigel™ presentaron un 55 % de hiperhidratación (Cuadro 3).

En cuanto al número de raíces y brotes estos no presentaron diferencias entre los tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 3

Porcentaje de vitro plantas hiperhidratadas de albahaca variedad Red Rubin en etapa de establecimiento in vitro en respuesta a Phytigel™ y Agar

Tratamiento (g/L)	42 días	84 días
Agar 5 g/L	0 ns	0 ^β
Phytigel™ 1.8 g/L	0	55
Valor t	1	6.9
Grados de libertad	59	59
Probabilidad	0.05	< 0.0001

Nota: ns: no hay diferencias significativas ($P > 0.05$); β significativo

Cuadro 4

Número de raíces y brotes por explante de albahaca variedad Red Rubin en etapa de establecimiento in vitro como respuesta a Phytigel™ y Agar

Tratamiento (g/L)	Raíces	Brotes
	21 días	42 días
Agar 5 g/L	1.45 ns	1.91 ns
Phytigel™ 1.8 g/L	1.08	1.96
Valor t	0.82	0.57
Grados de libertad	36	59
Probabilidad	0.05	0.05

Nota: ns: no hay diferencia significativa ($P > 0.05$)

En el cuadro 5 se muestra número de hojas por explante donde al día 21 ninguno de los tratamientos presenta diferencias en el número de hojas, pero al día 84 el tratamiento en Agar mostró diferencias en el número de hojas que el tratamiento en Phytigel™ (Cuadro 5). Los micro esquejes en Agar no mostraron hiperhidratación, sus hojas y raíces fueron abundantes (Figura 10).

Cuadro 5

Número de hojas por explante de albahaca variedad Red Rubin en etapa de establecimiento in vitro en respuesta a Phytigel™ y Agar

Tratamiento (g/L)	21 días	84 días
	Agar 5 g/L	2.82 ns
Phytigel™ 1.8 g/L	3.88	5.11
Valor t	2.04	2.16
Grados de libertad	36	59
Probabilidad	0.05	0.0406

Nota: ns: no hay diferencias significativas ($P > 0.05$); ^β significativo

El estudio realizado por Etienne y Berthouly (2002) sustentó que el tiempo de inmersión, la duración o la frecuencia con la que se realiza el cambio del medio de cultivo, influye en el desarrollo

de la hiperhidratación de las vitro plantas, lo que nos permite confirmar la hipótesis planteada donde la hiperhidratación es causada por no realizar un refrescamiento constante del medio de cultivo.

Figura 8

Establecimiento de segmentos nodales in vitro de albahaca variedad Red Rubin usando Phytigel™ 1.8 g/L como gelificante. (A) Día 21; (B) Día 42

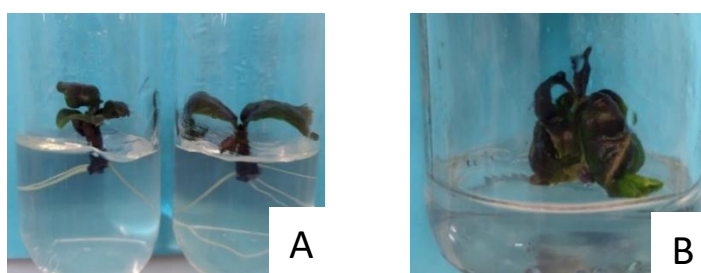


Figura 9

Establecimiento de segmentos nodales in vitro de albahaca variedad Red Rubin usando Agar 5 g/L como gelificante. (A) Día 21; (B) Día 42

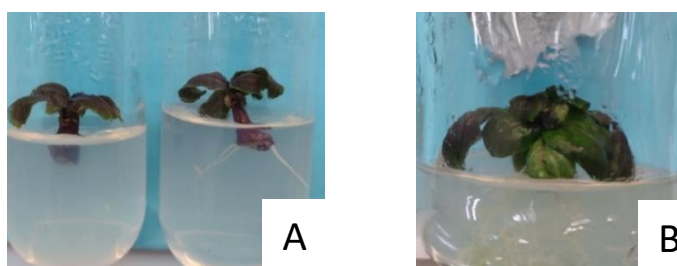
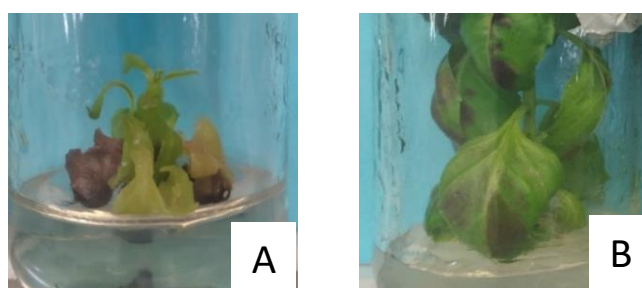


Figura 10

Vitro plantas de albahaca variedad Red Rubin. Tratamiento (A) Phytigel™ 1.8 g/L; (B) Agar 5 g/L al cabo de 42 días sin refrescamiento del medio de cultivo



Conclusiones

Las fitohormonas BAP y AIA no tienen ningún efecto en número de hojas, brotes y raíces en el establecimiento *in vitro* de albahaca variedad Red Rubin

La hiperhidratación o vitrificación en la albahaca de variedad Red Rubin es causada por el tiempo que permanece la vitro planta en el medio de cultivo sin refrescamiento.

Recomendaciones

Para el establecimiento de albahaca variedad Red Rubin se sugiere utilizar el medio sin fitohormonas y realizar refrescamientos cada 21 días.

Realizar pruebas en sistemas de inmersión temporal como método alternativo para evitar la hiperhidratación.

Referencias

- Arévalo Ayala AG. 2017. Evaluación de fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para la propagación *in vitro* de albahaca (*Ocimum basilicum L.*) a partir de meristemos [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Departamento de Ciencia y Producción Agrícola. 20 p; [consultado el 17 de may. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6047/1/CPA-2017-011.pdf>.
- Cardoso Ugarte GA, Sosa Morales ME. 2012. Propiedades del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum L.*) y sus aplicaciones en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos; [consultado el 17 de may. de 2021]. 6(1):54–65. [https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6\(1\)-Cardoso-Ugarte-et-al-2012.pdf](https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6(1)-Cardoso-Ugarte-et-al-2012.pdf).
- Casas Cendoya AM, Lasa Dolhagaray JM. 1986. Multiplicación "*in vitro*" en remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*). II. Vitrificación del material. An. Aula Dei; [consultado el 17 de may. de 2021]. 18(1-2):57–63. <https://digital.csic.es/handle/10261/13562>.
- Chacón AG, Saborío F, Gómez L, Torres S, Valverde R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Costarricense; [consultado el 17 de may. de 2021]. 24(2):57–64. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43624206>.
- Charles DJ. 2013. Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. New York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4614-4309-4.
- [CIAT] Centro Internacional de la Agricultura Tropical. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT. 1039 p. 151 vol. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/53954>.
- [DAFF] Department Agriculture Forestry and Fisheries. 2012. Basil production. Republic of South Africa: Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. 26 p; [consultado el 17 de may. de 2021]. <https://www.nda.agric.za/docs/Brochures/ProGuiBasil.pdf>.

- Dode LB, Bobrowski VL, Bolacel Braga EJ, Seixas FK, Schuch MW. 2003. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (*Lamiaceae*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 25(2):435–437.
- Etienne H, Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69(3):215–231. doi:10.1023/A:1015668610465.
- López Encina C. 1996. Vitrificación de plantas cultivadas *in vitro*. España: Universidad de Málaga; [consultado el 18 de may. de 2021]. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros28/28vitrificacion.html>.
- Olmos S, Luciani G, Galdeano E. 2010. Micropropagación. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editores. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: ArgenBio. p. 353–362.
- Saha S, Kader A, Sengupta C, Ghosh P. 2012. *In Vitro* Propagation of *Ocimum gratissimum* L. (*Lamiaceae*) and Its Evaluation of Genetic Fidelity Using RAPD Marker. *AJPS*. 3(1):64–74. doi:10.4236/ajps.2012.31006.
- Sahoo Y, Pattnaik 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. doi:10.1007/s11627-997-0053-3.
- Siddique I, Anis M. 2008. An improved plant regeneration system and *ex vitro* acclimatization of *Ocimum basilicum* L. *Acta Physiol Plant*. 30:493–499. doi:10.1007/s11738-008-0146-6.
- Villegas MÁ, Cárdenas LMA. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*; [consultado el 17 de may. de 2021]. 25(2):213–217.