

CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES CIGÓTICOS: UNA ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN PARA *Austrochthamalia teyucuaensis*

H.A. Keller

IN VITRO CULTURE OF ZYGOTIC EMBRYOS: A CONSERVATION STRATEGY FOR *Austrochthamalia teyucuaensis* H.A. Keller

Fecha de recepción: 14/09/2016 //Fecha de aceptación: 02/05/2017

Evelyn Duarte

Ingeniera Forestal-Doctora en Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Forestales (FCF)-Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Comité Ejecutivo de Desarrollo e innovación tecnológica (CEDIT). Jefe de trabajos prácticos interino de la cátedra de biología vegetal. Becaria posdoctoral CONICET-CEDIT

Dirección: Degener 2346 Km 2. Eldorado-Misiones
e-mail: evelynfcf@yahoo.com.ar

Sandra Patricia Rocha

Ingeniera Forestal, Mgter.Docente Facultad de Ciencias Forestales-Universidad Nacional de Misiones. Bertoni 124, Eldorado-Misiones. Email: procha910@gmail.com

Fernando Niella

Ingeniero Forestal, Mgter.Docente Facultad de Ciencias Forestales-Universidad Nacional de Misiones. Bertoni 124, Eldorado-Misiones. Email: fernandoniella@gmail.com

RESUMEN

Austrochthamalia teyucuaensis es una especie endémica de la Misiones que tiene un alto potencial como ornamental pero debido al número reducido de su población se encuentra en peligro crítico. Si bien se han registrado altos porcentaje de germinación de las semillas de *A. teyucuaensis*, pocas plantas prosperan hasta llegar a ser un individuo fértil y no hay registros de propagación asexual. El objetivo de este trabajo es proponer una alternativa de propagación, empleando la técnica del cultivo *in vitro*. Esta técnica es una excelente alternativa para producir plantas en un corto periodo y de buena calidad, para conservar en bancos de germoplasma *ex situ*. Semillas cosechadas en el Paraje teyú Cuaré fueron sometidas a dos tratamientos de desinfección, variando el tiempo de inmersión en peróxido de hidrógeno y los embriones fueron cultivados en dos medios de cultivos el Murashige y Skoog y el Shenk y Hildebrandt, en sus concentraciones originales con agar 6 g.L⁻¹, libre de sacarosa y reguladores de crecimiento. Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos de desinfección fueron igualmente efectivos para la eliminación de patógenos, lográndose un 100% de cultivos libre de hongos y bacterias. Los medios de cultivos fueron apropiados para el cultivo de embriones de esta especie

SUMMARY

Austrochthamalia teyucuaensis is an endemic species of the Province of Misiones that has a high potential as ornamental plant but due to the small number of its population it is in critical danger. Although high percentage of germination of *A. teyucuaensis* seeds has been recorded, few plants thrive until they become fertile individuals and there are no records of asexual propagation. The objective of this work is to propose an alternative of propagation, using the *in vitro* culture technique. This technique is an excellent alternative to produce plants in a short period and of good quality, to preserve in banks of *ex situ* germplasm. Seeds harvested in Teyu Cuaré were subjected to two disinfection treatments, varying the time of immersion in hydrogen peroxide and the embryos were grown in two media of cultures Murashige and Skoog and Shenk and Hildebrandt, in their original concentrations with agar 6 g.L⁻¹, sucrose free and growth regulators. The obtained results indicated that the disinfection treatments were equally effective for the elimination of pathogens, achieving a 100% of cultures free of fungi and bacteria. The culture media were appropriate for the culture of embryos of this species obtaining a 100% of germination. The disinfection procedures and the

obteniéndose un 100% de germinación. Los procedimientos de desinfección y medios de cultivos empleados han permitido lograr exitosamente el establecimiento y germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *A. teyucuaensis*.

Palabras claves: Endémicas, Apocináceas, semillas

culture media used have successfully led to the establishment and *in vitro* germination of *A. teyucuaensis* embryos.

Key words: Endemic, Apocinaceae, Seeds.

INTRODUCCIÓN

La conservación de germoplasma de la diversidad vegetal se puede dar de dos maneras, una es la *in situ* donde las especies se mantienen en su hábitat natural, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas (GARCÍA-ÁGUILA, *et al.*, 2007). La otra es la conservación *ex situ* donde las especies se preservan fuera de su hábitat natural, en bancos de semillas botánicas, bancos de plantas en campo o en bancos de plantas *in vitro*. Este último sistema de conservación constituye una parte esencial de la estrategia general de conservación y el intercambio de recursos genéticos en el mundo. Las ventajas, que ofrece el mismo son la posibilidad de almacenar un gran número y variedad de muestras en un área reducida, además de garantizar la sanidad de las muestras e incrementa la posibilidad del intercambio de materiales vegetales. (MARRERO GOMEZ *et al.* 2002, GARCÍA-ÁGUILA, *et al.*, 2007).

La propagación por medio del cultivo *in vitro* tiene la ventaja que permite, mediante una pequeña porción de planta (explante), obtener muchos ejemplares con las características deseadas de individuos elites seleccionados. Por lo tanto es importante desarrollar protocolos de multiplicación, que permitan obtener plantas con características morfológicas adecuadas para su traslado a condiciones de campo (ÁLVAREZ *et al.*, 2011). Esta técnica como herramienta biotecnológica es una alternativa viable para el rescate, conservación y masificación de especies nativas (VIDAL *et al.*, 2011).

Para muchas especies, la conservación *ex situ* se convierte en la única estrategia viable para salvar a las especies de la extinción a través de los bancos de semillas o que viven colecciones establecidas a través de la propagación vegetativa (bancos de germoplasma *in vitro*) (PIMM 2008; BUNN *et al.* 2011). Dado que las especies amenazadas presentan problemas como, la endogamia que da lugar a bajos rendimientos de semilla (Hendrix y Kyhl 2000), o la dormancia que estas poseen a menudo sin resolver (MERRITT Y DIXON 2003; MERRITT *et al.* 2007). Además, la disponibilidad de semillas viables se ve obstaculizada por la escasez e irregularidad en la producción de éstas debido a las tensiones ambientales como la sequía, la depredación o enfermedad (o simplemente por información insuficiente sobre el tiempo óptimo para la recolección de semillas), limitando de esta manera la

disponibilidad de explantes (BUNN *et al.* 2011). Otro aspecto a tener en cuenta para mantener la diversidad genética de una especie en una condición estable y sin que las técnicas de cultivos utilizadas pongan en peligro la estabilidad genética de las plantas, siempre será más conveniente utilizar cultivos de ápices de vástagos o embriones cigóticos, que minimizan los riesgos de variación en comparación con otros sistemas de cultivo como el de protoplastos o células (VILLALOBOS Y ENGELMANN 1995).

El objetivo de la conservación es evitar la extinción de las especies, sus genes y los procesos que realizan. En las poblaciones pequeñas el riesgo de extinción es mayor que en las grandes. El impacto es tan alto, que incluso en un entorno perfectamente constante, se enfrentan al riesgo de extinción a causa de anomalías demográficas en el suelo (PIMM *et al.* 1988). En tales situaciones, asegurar la reproducción es de suma importancia (BOND 1994), para la reducción del riesgo de su extinción (TARLTON 2013). La propagación y almacenamiento de plántulas en bancos de germoplasmas *in vitro* ha demostrado ser una manera eficaz para proporcionar material genético de respaldo para las especies de plantas en peligro de extinción en la naturaleza antes que las medidas de conservación *in situ* que se pudieran tomar. Además, estos materiales en los bancos, pueden servir para proporcionar recursos con fines paisajístico y cultural de jardines locales, como de parques urbanos (SUGII 2011).

Austrochthamalia teyucuaensis H. A. Keller, es un especie endémica de la provincia de Misiones perteneciente a la familia Apocynaceae, que posee un alto potencial como especie ornamental pero se encuentran en peligro crítico (IUCN 2001). Esta especie crecen pastizales con abundancia de *Axonopus suffultus* (Poaceae) y *Allagoptera campestris* (Araceae), y con árboles como *Acosmium subelegans* (Fabaceae). Posee inflorescencias subaxilares, postradas y bifloras. La floración se inicia en septiembre y se prolonga hasta febrero, su fruto es un folículo. Desde noviembre hasta marzo se pueden encontrar frutos en diferentes estados de maduración. Las semillas son marrones de 1-1,2 x 0,5- 0,6 cm, con superficie corrugada, un fruto puede contener unas 65-84 semillas. Si bien las semillas *A. teyucuaensis* pueden presentar altas tasa de germinación (90%), son relativamente pocas las plantas que prosperan hasta llegar a ser un individuo fértil y no hay registros de propagación asexual ni de propagación *in vitro*. La única población conocida de la especie

cuenta con alrededor de 100 ejemplares y se encuentran en área de reserva protegida (KELLER 2015). Frente a las condiciones antes explicadas es que en este trabajo se propone una alternativa de propagación, empleando la técnica del cultivo *in vitro*. Esta técnica es una excelente alternativa para producir gran cantidad de plantas en un corto periodo y de buena calidad, tanto para conservar la especie con fines ecológicos como para estudiarla bajo condiciones *in vitro* como *ex vitro*, y así generar más información de la misma (entre ellos el de encontrar el ambiente en el que mejor crece y se establece).

MATERIALES Y METODOS

Las semillas fueron cosechadas en el Paraje teyú Cuaré, Depto. San Ignacio, Misiones (27° 16' 43,9'' S – 55° 33' 44,9'' W) en el mes de agosto y almacenadas durante dos meses a 4°C en frascos de vidrio. La desinfección de las semillas consistió en dos etapas: 1) Sumergir las mismas en una solución peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 10 volúmenes durante 30 minutos, a continuación en alcohol 70% durante un minuto y luego se las transfirió a una solución comercial (60 g.L⁻¹ de cloro activo) de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% con dos gotas de Tween 20® durante 20 minutos. 2) Sumergirlas en H₂O₂ 10 volúmenes durante 16 horas, después en alcohol 70% durante un minuto y luego se las traspasó a una NaClO al 1,5% con dos gotas de Tween 20® durante 20 minutos, después de los lavados con desinfectantes, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Todo el proceso de desinfección se realizó en cámara de flujo laminar y una vez finalizado se procedió a extraer los embriones de las semillas. Los medios de cultivo utilizados para el cultivo fueron el MS (MURASHIGE Y SKOOG, 1962) y el SH (SCHENK Y HILDEBRANDT, 1972), en sus concentraciones originales, adicionados con agar 6 g.L⁻¹, libre de sacarosa y de reguladores de crecimiento. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, los tratamientos empleados se expresan la tabla 1.

Tabla 1: Diferentes tratamientos según la desinfección y medios de cultivos utilizados para el cultivo de embriones cigóticos de *A. teyucuaensis*.
Table 1: Different treatments according to disinfection and culture media used for the culture of embryos of *A. teyucuaensis*.

Tratamientos	Desinfección	Medio de cultivo
1	PH 10 vol 30 min + etanol 70 % + NaClO 1,5 %	MS
2	PH 10 vol 30 min + etanol 70 % + NaClO 1,5 %	HS
3	PH 10 vol 16 horas + etanol 70 % + NaClO 1,5 %	MS
4	PH 10 vol 16 horas + etanol 70 % + NaClO 1,5 %	HS

Se dispusieron dos embriones por tubo de 50 ml de capacidad, los cuales contenían 10 ml de medio cultivo y a continuación los tubos con los embriones se incubaron durante 30 días en condiciones controladas de luz (116 μmol.m⁻². s⁻¹, PAR, fotoperiodo 14 horas) y temperatura (27±2 °C). A los 7 días desde la siembra, se determinó el porcentaje de germinación de las semillas (PG) y porcentaje de desinfección (PD).

Al cabo de un mes las plántulas fueron subcultivadas a medios frescos, compuesto por el medio basal MS en su concentración original con el agregado de sacarosa (20 g.L⁻¹) y agar (6 g.L⁻¹), en frascos de 300 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo, se cultivaron cuatro plantas por frasco y transcurrido 30 días se evaluó la sobrevivencia de las plantas.

Análisis estadístico

Los resultados de PG y PD fueron sometidos a análisis de varianza (Anova) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de error, utilizando software Infostat (2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los agentes desinfectantes utilizados y el proceso de desinfección realizado en los dos tratamientos demostraron diferencias estadísticamente no significativas, por lo que ambos pueden ser considerados efectivos para la eliminación de patógenos (hongos y bacterias), permitiendo la germinación de los embriones libre de contaminación (Tabla 2, Figura 1).

Tabla 2: Efecto de los diferentes tratamientos sobre la desinfección y germinación de embriones *Austrochthamalia teyucuaensis*.

Table 2: Effects of the different treatments over disinfection and germination of *Austrochthamalia teyucuaensis* embryos.

Tratamiento	PG (%)	PD (%)
1	100a	0a
2	100a	0a
3	100a	0a
4	100a	0a

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, P ≤ 0.05).

El mayor éxito del establecimiento *in vitro* de cultivos de plantas en peligro depende principalmente de desarrollar óptimos métodos de desinfección de las semillas viables y superar la contaminación *in vitro* que lleva a la pérdida de valiosos propágulos (SUGII 2011).

El hipoclorito de sodio es un desinfectante eficaz altamente recomendado para el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos (MANJARRÉS-

HERNÁNDEZ y PEREA-DALLOS 2012; FERNÁNDEZ *et al.* 2016). Por otro lado el peróxido de hidrógeno si bien se utiliza para desinfección de semillas es un excelente inductor de germinación (DUARTE *et al.* 2014).

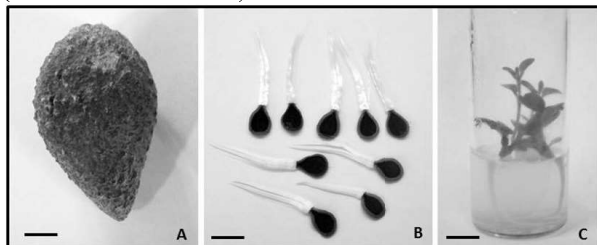


Figura 1: *Austrochthamalia teyucuaensis*. A) Fruto. B) Semillas. C) Plántulas *in vitro* después de 30 días de cultivo. La barra indica 1 cm.

Figure 1: *Austrochthamalia teyucuaensis*. A) Fruit. B) Seeds. C) Seedlings *in vitro* after 30 days of culture. The bar indicates 1 cm.

Se consideró que el embrión germinó cuando la radícula presentó una longitud de 5 mm el proceso morfogénico se inició a los dos días del cultivo. A los 7 días del establecimiento, se registró un 100 % de emergencia de las vitropantallas en ambos medios. En las mismas se observó un adecuado crecimiento, de aspecto vigoroso y coloración verde oscura en sus hojas. El propósito del cultivo de embriones es obtener plantas de tamaño uniforme y libre de patógenos, ya que acelera el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas. De ahí la importancia de utilizar esta técnica como una alternativa para la propagación de especies que tienen semillas que presentan dormancia o de especies en peligro (CALDERON-BALTIERRA *et al.* 1993; GARCIA *et al.* 2002; TZEK SIMA *et al.* 2006; SOARES *et al.* 2011, ZURITA-VALENCIA *et al.* 2014).

Diversos trabajos han reportado que el medio basal MS puede ser empleado con éxito en el cultivo de embriones de especies amenazadas tales como los protocolos publicados para *Gomortega keule* (CALDERON-BALTIERRA *et al.* 1993), *Sternbergia fischeriana* (MIRICI *et al.* 2005) y *Muscarimurum* (NASIRCILAR *et al.* 2011).

Al cabo de un mes las plantas alcanzaron una altura promedio de $3,5 \pm 0,92$ cm y fueron repicadas a medios frescos adicionados con sacarosa, la sobrevivencia de las plantas fue del $48,38 \pm 8,53\%$ (Figura 2). Las plantas antes de perecer no presentaron ningún síntoma de clorosis ni de infección bacteriana o fúngica, solamente una coloración marrón clara desde el ápice hacia la radícula. Las semillas de *A. teyucuaensis* para este estudio fueron obtenidas de una única población identificada en la provincia de Misiones que cuenta con tan solo 100 individuos. Según VERGEER *et al.* (2003) las especies de poblaciones pequeñas producen menos semillas por fruto. Sus semillas tienen tasas de germinación más bajas debido a que tienen mayor cantidad de semillas

inactivas o no viables y existe una mayor mortalidad de las plántulas. La fragmentación de hábitat es uno de los factores que tienen un efecto negativo sobre la adecuación biológica de las plantas ya que ocasionan una reducción en la cantidad y calidad de semillas producidas. Los factores que disminuyen la cantidad de plantas obtenidas por semillas, debido a la baja calidad de estas, pueden transformarse en una amenaza para la sobrevivencia de las poblaciones a largo plazo (HENRÍQUEZ 2004). La baja cantidad de individuos en una población promueve la autofecundación (HERLIHY *et al.* 2002) y las plantas obtenidas de semillas por autofecundación producen menos flores que las provenientes de semillas por polinización cruzada, y por ende menor cantidad de frutos y semillas (JOHNSTON 1992). Los linajes de autofecundación tienen un potencial reducido para adaptarse a los ambientes cambiantes y por ende es menor su capacidad para persistir en el largo plazo (WRIGHT *et al.* 2013).



Figura 2: Sobrevivencia de *Austrochthamalia teyucuaensis*. Izquierda plantas que sobrevivieron. Derecha plantas que perecieron durante el ensayo. La barra indica 1 cm.

Figure 2: Survival of *Austrochthamalia teyucuaensis*. Left: plants that survived. Right: plants that perished during the test. The bar indicates 1 cm.

CONCLUSIÓN

Los tratamientos de desinfección combinando diferentes tiempos de lavado con peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, han demostrado ser efectivos en el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos *A. teyucuaensis* y los medios de cultivos empleados (SH y MS) permitieron un alto porcentaje de germinación (100%) de los embriones. Por lo que el empleo de uno u otro procedimiento de desinfección como de los medios de cultivo pueden ser considerados para futuros cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos al Dr. Keller por proveer las semillas que se utilizaron en este ensayo y por brindar información de la especie, a la Facultad de Ciencias Forestales por su colaboración para la ejecución de esta investigación y al CONICET por la beca otorgada.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, M. J., Beltrán, P., Diana, M. I. I., & Neftali, M. L. 2011. Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* roxb. *Revista Tumbaga*, 6, 107-124.
- BOND, W.J., 1994. Fire survival of Cape Proteaceae-influence of Fire Season and Seed Predators. *Vegetatio*, 56, 65-74.
- BUNN, E., Turner, S. R., Dixon, K. W. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 47(1), 188-200.
- CALDERON-BALTIERRA, X., Perez, F., Rotella, A. 1993. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: Gomortegakeule (Mol.) Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). *Bosque*, 14(1), 23-28.
- DUARTE, E., Acevedo, M., Sansberro, P., Luna, C. 2014. Detección de daño del coleóptero *Amblyceruslongesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. exSteudel). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 113(1), 18-27.
- FERNÁNDEZ, C. F., Lezcano, M. I. D., Segnana, L. R. G. 2016. Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Acrocomiaaculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. *Colombia Forestal*. 19(1), 67-78.
- GARCIA, J., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso, A. 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *PlantCell, Tissue and Organ Culture*, 69:95-100.
- GARCÍA-ÁGUILA, L., de Feria, M., Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Bioteología Vegetal*. 7(2): 67 – 79.
- HENDRIX, S. D., Kyhl J. F. 2000. Population size and reproduction in *Phlox pilosa*. *Conserv. Biol*. 14: 304–313.
- HENRÍQUEZ, C. A. 2004. Efecto de la fragmentación del hábitat sobre la calidad de las semillas en *Lapageria rosea*. *Revista chilena de historia natural*. 77 (1): 177-184.
- HERLIHY, C. R., Eckert, C. G. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature*. 416(6878), 320-323.
- INFOSTAT. 2014. Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba / Editorial Brujas. Argentina.
- IUCN (International Union for the Conservation of Nature). 2001. The IUCN redlistofthreatenedspecies, version 2001. IUCN RedList Unit, Cambridge U.K. Availablefrom: <http://www.iucnredlist.org/> (Consultado 11 de Junio 2015).
- JOHNSTON, M. O. 1992. Effects of cross and self-fertilization on progeny fitness in *Lobelia cardinalis* and *L. siphilitica*. *Evolution*. 688-702.
- KELLER, H. A. 2015. *Austrochthamalia teyucuaensis* (Apocynaceae: Asclepiadoideae), una nueva especie endémica de Misiones, Argentina. *Lilloa* 52 (1): 1-6.
- KRAMER, A.T., Havens, K., 2009. Plant Conservation Genetics in a Changing World. *Trends in plant science*, 14 (11): 599-607.
- MANJARRÉS-HERNÁNDEZ, E. H., Perea-Dallos, M. 2012. Establishment of a purple passion fruit (*Passifloraedulis* Sims.) propagation protocol from zygotic embryos and axillary shoots. *Agronomía*. 20(2), 53-64.
- MARRERO-GÓMEZ, M. N., Bañares-Baudet, A., Álamo, E. C. 2002. Planificación de la conservación de los recursos vegetales en espacios naturales protegidos canarios. *RevistaEcosistemas*. 11(3).
- MERRITT, D. J., Dixon K. W. 2003. Seed storage characteristics and dormancy of Australian indigenous plant species. In: Smith R. D., Dickie J. B., Linington S. H., Pritchard H. W., Probert R. J. (eds) Seed conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens Kew, Cromwell, London, pp 809–823.
- MERRITT, D. J.; Turner S. R., Clarke S., Dixon K. W. 2007. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Aust. J. Bot.* 55: 336–344.
- MIRICI, S., Parmaksız, İ., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, S., Sarihan, E. O., Gumuscu, A., Gurbuz, B., Arslan, N. 2005. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 80 (3): 239-246.

- MURASHIGE, T., Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NASIRCILAR, A. G., Mirici, S., Karagüzel, Ü. Ö., Eren, Ö., Baktir, I. 2011. *In vitro* propagation of endemic and endangered *Muscarrimum* from different explant types. *Turkish Journal of Botany*, 35(1): 37-43.
- PIMM, S.L., 2008. Biodiversity: Climate Change or Habitat Loss - Which will Kill More Species? *Current biology*, 18 (3): 117-119.
- SCHATZ, G.E., 2009. Plants on the IUCN Red List: Setting Priorities to Inform Conservation. *Trends in plant science*, 14 (11): 638-42.
- SCHENK, R.U., Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204
- SOARES, J.; Rodrigues, F., Pasqual, M., Nunes, C., Araujo, A. 2011. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online. ISSN 0103-8478
- SUGII, N. C. 2011. The establishment of axenic seed and embryo cultures of endangered Hawaiian plant species: special review of disinfestation protocols. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1): 157-169.
- TARLTON, S. 2013. *Conservation and propagation of the critically endangered *Protearoupellia* ssp. *hamiltonii** (Doctoral dissertation). Faculty of Science, University of the Witwatersrand. 192 pp.
- TZEC-SIMÁ, M., Orellana, R., Robert, M. 2006. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan peninsula (Mexico). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.42, p.54-58
- VERGEER, P., Rengelink, R., Copal, A. y Ouborg, N. J. 2003. The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology*, 91: 18-26.
- VIDAL, J., Sabja, A. M., Ríos-Leal, D., Lara-Aguilar, A., Donoso, P. J., González, M. E., & Escobar, B. 2011. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Fitzroya cupressoides* en Sudamérica Austral. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 17(3): 423-433.
- VILLALOBOS, V. M., Engelmann, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using Biotechnology. *World journal of microbiology and Biotechnology*, 11(4): 375-382.
- WRIGHT, S. I., Kalisz, S., Slotte, T. 2013. Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. In *Proc. R. Soc. B*. The Royal Society. 280 (1760): 201-301
- ZURITA-VALENCIA, W., Gómez-Cruz, J. E., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M. E., García-Magaña, J. J., Salgado-Garciglia, R., Sánchez-Vargas, N. M. 2014. Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*tilia mexicanaschlecht.*) (tiliaceae). *Polibotánica*, (38): 129-144.