

# Micropropagación de *Glandularia*, género nativo con potencial ornamental <sup>1</sup>

## Micropropagation of *Glandularia*, native genus with ornamental potencial

María Teresa Ponce<sup>2</sup>  
Mónica Elizabeth Guiñazú<sup>2</sup>

Sonia Fioretti<sup>3</sup>  
Miguel Cirrincione<sup>2</sup>

Originales: Recepción: 26/05/2009 - Aceptación: 15/09/2010

### RESUMEN

En este trabajo se estableció un protocolo de propagación *in vitro* de tres especies nativas del género *Glandularia*: *G. peruviana*, *G. sp.* y *G. laciniata*. Para el establecimiento *in vitro* se evaluó el medio de Murashige Skoog (MS) con macro y micronutrientes diluidos a la mitad adicionado con 0,05  $\mu\text{M}$  de bencilaminopurina (BAP) sola o en combinación con 0,1  $\mu\text{M}$  thiadiazuron (TDZ) y un testigo sin reguladores del crecimiento. En la etapa de multiplicación se evaluó el medio de cultivo MS diluido a la  $\frac{1}{2}$  ó  $\frac{1}{4}$  y adicionado de 20 ó 40  $\text{gr.L}^{-1}$  de sacarosa. Es posible establecer y micropropagar estas especies en medios de cultivo sencillos. El medio más eficiente para el establecimiento fue aquel sin reguladores, mientras que el más adecuado para la multiplicación fue MS  $\frac{1}{2}$  adicionado de 20  $\text{gr.L}^{-1}$  de sacarosa, en el cual la tasa de multiplicación cada 30 días fue de 6 en *G. sp.* y *G. peruviana* y 4 para *G. laciniata*.

### SUMMARY

In this work there was established a protocol of micropropagation of three native species of the genus *Glandularia*, *G. peruviana*, *G. sp.* and *G. laciniata*. Macro and micronutrients half strength Murashige Skoog (MS) media added with BAP 0.05  $\mu\text{M}$  alone or in combination with TDZ 0.1  $\mu\text{M}$  were tested in the establishment stage. Half and quarter strength MS media with 20 or 40  $\text{g.L}^{-1}$  of sucrose were assayed at multiplication stage. It is possible to establish and to micropropagate these species in simple culturing media. The most efficient media for establishment stage was that one without growth regulators, whereas the most suitable for the multiplication it was MS  $\frac{1}{2}$  with 20  $\text{g.L}^{-1}$  of sucrose, where the multiplication rate every 30 days were 6 for *G. sp.* and *G. peruviana* and 4 for *G. laciniata*.

### Palabras clave

ornamentales • autóctonas • cultivo de tejidos • Verbenaceae

### Keywords

ornamentals • autochthonous • tissue culture • Verbenaceae

1 Trabajo financiado por el Proyecto BIANUAL SECTYP-UNCuyo 06/A271 y por el Proyecto INTA 1837.

2 Cát. de Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Biológicas.

3 Cát. de Espacios Verdes. Dpto. de Producción Agropecuaria.

Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. mponce@fca.uncu.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

El uso de germoplasma nativo para la obtención de plantas ornamentales tiene en Argentina un desarrollo incipiente a partir de la década del 90. Según Dalmasso (3) la opción de utilizar especies nativas que han evolucionado en épocas ecológicas anteriores y se han adaptado al ambiente natural que aún hoy persiste, facilita un manejo con una mínima intervención, siendo buenas competidoras bajo las condiciones climáticas del lugar.

Desde hace varios años, en la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, se trabaja en el estudio de especies nativas con interés ornamental. En este marco, en la Cátedra de Fisiología Vegetal se han realizado trabajos de micropropagación de especies nativas tales como *Lippia integrifolia* (11), *Junellia minutifolia* (12), *Glandularia perakii* (6) y *Lecanophora heterophylla* (13), entre otras.

*Glandularia* (Verbenaceae) es un género americano con 42 especies nativas de Argentina de las cuales 15 son endémicas (7), encontrándose una alta concentración de especies en la Provincia de Mendoza (15). Crecen en lugares abiertos, campos gramíneos, bordes de caminos, margen de selvas, laderas de cerros (2). Son generalmente plantas postrado-ascendentes, con flores subsésiles de colores variados, reunidas en racimos contraídos; muchas tienen flores llamativas por su tamaño, color y fragancia; poseen prolongados periodos de floración (2). Este género -además de presentar caracteres estéticos y ornamentales de interés- posee una gran adaptabilidad a condiciones desfavorables, lo que lo hace atractivo para su introducción a cultivo y mejoramiento (17).

En la actualidad, existe un creciente interés por explorar alternativas ornamentales en nuevas especies de este género o mejorar los caracteres diferenciales de las especies que actualmente se comercializan (14). En este contexto la biotecnología brinda la posibilidad de generar variabilidad genética a través de la poliploidización (4).

### Objetivo

Establecer protocolos de micropropagación de tres especies nativas del género *Glandularia* como paso previo a la obtención de poliploides *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento *in vitro*

#### *Material vegetal*

Se trabajó con *Glandularia sp.*\*, *G. laciniata* y *G. peruviana* (fotos, pág. 163). Las plantas de *G. sp.* se recolectaron en la zona de Potrero de los Funes, Provincia de San Luis. Las plantas se extrajeron con raíz y se colocaron en bolsas plásticas con papel absorbente humedecido, posteriormente se colocaron en invernáculo en macetas con

---

\* No se ha podido determinar fehacientemente en este caso la especie.

tierra de la zona de origen. Las plantas de *G. laciniata* se recolectaron en la zona de Chacras de Coria, Provincia de Mendoza, se colocaron en macetas en invernáculo. En el caso de *G. peruviana* se trabajó con plantas provistas por la Cátedra de Espacios Verdes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo. De estas plantas madres se extrajeron trozos de tallos para hacer la introducción a condiciones *in vitro*.

La esterilización consistió en el lavado de los tallos con agua corriente y tensio-activo; luego se sumergieron en alcohol 96 al 70% dos minutos, para posteriormente tratarlas con solución de hipoclorito de sodio (lavandina comercial 55 g.L<sup>-1</sup> de cloro activo) al 10% durante 10 minutos. Se realizaron tres enjuagues con agua estéril bajo campana de flujo laminar y se procedió a la obtención de estacas uninodales.



Flores de *G. laciniata*.  
Flowers of *G. laciniata*.

Flores de *G. sp.*  
Flowers of *G. sp.*



Flores de *G. peruviana*.  
Flowers of *G. peruviana*.

### *Tratamientos*

El medio de cultivo utilizado fue Murashige Skoog (8), (MS) con macro y micronutrientes diluidos a la mitad, adicionado de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, pH 5,8. Se ensayaron cuatro tratamientos: 1) sin reguladores del crecimiento, 2) 0,1 µM de thidiazuron (TDZ), 3) 0,05 µM bencilaminopurina (BAP) y 4) 0,1 µM de TDZ combinado con 0,05 µM de BAP. El ensayo se repitió dos veces y las repeticiones por tratamiento variaron entre 12 y 25. En todos los casos se utilizaron tubos de ensayo de 2 x 15 cm, con 25 ml de medio de cultivo, los cuales se sellaron con film de PVC.

### *Variables evaluadas y diseño estadístico*

Después de cuatro semanas de establecido el cultivo se determinó porcentaje de explantes que presentaron crecimiento, porcentajes de explantes vitrescentes, porcentaje de explantes que enraizaron, altura de planta, número de brotes, número de nudos y número de raíces por explante establecido. El diseño estadístico utilizado fue parcelas al azar, cada tubo se consideró una repetición. Los tubos distribuidos al azar en la gradilla se llevaron a cámara de crecimiento.

## **Multiplicación**

### *Material vegetal*

Se utilizaron estacas uninodales provenientes de plantas *in vitro*.

### *Medio de cultivo*

El medio basal consistió en macro, micro y vitaminas de MS, el pH se ajustó a 5,8-5,9 y se solidificó con 7 g.L<sup>-1</sup> de agar.

### *Tratamientos*

Se ensayaron dos diluciones del medio MS, ½ y ¼ y dos concentraciones de sacarosa 20 y 40 g L<sup>-1</sup>. Se utilizaron frascos de vidrio de 250 cc de capacidad con 50 ml de medio. Se sembraron 5 estacas uninodales por tratamiento. El ensayo se repitió dos veces.

### *Variables evaluadas*

Después de cuatro semanas de establecido el cultivo se determinó porcentaje de explantes que presentaron crecimiento, porcentaje de explantes que enraizaron, altura de planta, número de brotes, número de nudos y número de raíces por explante. El número de nudos obtenidos por explante se consideró como tasa de multiplicación. Se sembraron entre 10 y 15 frascos por tratamiento, cada planta se consideró una repetición. Los frascos se distribuyeron al azar en la cámara de crecimiento.

### *Análisis estadístico*

Los datos de porcentajes se compararon a través de la Prueba de comparación de proporciones; el resto de las variables se evaluaron por el ANOVA, realizando transformación de variables cuando fue necesario. Las medias se compararon con el test LSD. Se utilizó el software STATGRAPHICS Plus Versión 4.

### *Condiciones de cultivo*

Tanto los tubos como los frascos se llevaron a cámara de crecimiento a 16 h de luz y 8 h de oscuridad, intensidad lumínica de 70 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> y temperatura de 26 ± 2°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento *in vitro*

El uso de citocininas en el medio de establecimiento tiene como objeto interrumpir la dominancia apical, estimular el crecimiento de las yemas laterales, como así también inducir la formación de yemas adventicias, de tal manera de favorecer un crecimiento adecuado de los explantes. Sin embargo, la respuesta de los explantes a estos reguladores está altamente afectada por el genotipo (16) y dependiendo de éste, la presencia de citocininas puede inhibir el enraizamiento (1), estimular la aparición de explantes vitrescentes (5, 6) y la formación de callos.

En el establecimiento *in vitro* de *Glandularia*, todas las especies evaluadas y en los cuatro tratamientos, el porcentaje de explantes que crecieron fue superior al 80%; no se observaron diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada especie. En *G. sp.* sólo se encontraron diferencias significativas en la producción de múltiples brotes en el tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de TDZ. En *G. laciniata* no se observaron diferencias en el porcentaje de explantes que produjeron múltiples brotes, mientras que la presencia de TDZ produjo mayor formación de callo basal, explantes vitrescentes e inhibió el enraizamiento de los mismos. En *G. peruviana*, ningún tratamiento estimuló la formación de múltiples brotes: este comportamiento refuerza el concepto de la respuesta diferencial de las especies a la acción de los reguladores del crecimiento. En esta especie los tratamientos no afectaron la emisión de raíces puesto que en todos ellos se observó 100% de enraizamiento, indicando un nivel endógeno de auxinas adecuado para la rizogénesis y ausencia de la acción inhibitoria del TDZ observado en *G. laciniata* (tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto del BAP y el TDZ sobre el porcentaje de explantes con crecimiento, vitrescencia, callo basal y enraizamiento durante el establecimiento *in vitro* de *G. sp.*, *G. laciniata* y *G. peruviana*.

**Table 1.** Effect of BAP and TDZ on percentage of explants with growth, vitrescencia, basal calli, rooting during *in vitro* establishment of *G. sp.*, *G. laciniata* y *G. peruviana*.

Especie	Reguladores del crecimiento		N	Explantes con crecimiento (%)	Explantes vitrescentes (%)	Explantes con callo basal (%)	Explantes con múltiples brotes (%)	Explantes enraizados (%)
	BAP $\mu\text{M}$	TDZ $\mu\text{M}$						
<i>G. sp.</i>	0	0	8	100 a	0 a	0 a	0 b	10 a
	0	0,1	9	100 a	0 a	10 a	55 a	33 a
	0,05	0	11	100 a	0 a	36 a	0 b	73 a
	0,05	0,1	8	100 a	0 a	10 a	0 b	37 a
<i>G. laciniata</i>	0	0	12	100 a	0 b	0 b	88 a	100 a
	0	0,1	17	92 a	46 a	100 a	100 a	0 b
	0,05	0	14	95 a	0 b	0 b	90 a	100 a
	0,05	0,1	16	89 a	44 a	89 a	100 a	0 b
<i>G. peruviana</i>	0	0	13	100 a	-	-	7,7 a	100 a
	0	0,1	13	81 a	-	-	7,7 a	100 a
	0,05	0	20	100 a	-	-	0 a	100 a
	0,05	0,1	14	94 a	-	-	0 a	100 a

Letras distintas indican diferencias significativas para un  $p < 0,05$ .

(-) Variables no evaluadas en estas especies

En la siguiente foto se presentan plantas de *G. laciniata* obtenidas a partir de estacas uninodales en la etapa de establecimiento *in vitro*.



Plantas de *G. laciniata* obtenidas en la etapa de establecimiento *in vitro*. De izquierda a derecha las plantas corresponden a los tratamientos 1) sin reguladores, 2) 0,1  $\mu\text{M}$  TDZ, 3) 0,05  $\mu\text{M}$  BAP y 4) 0,1  $\mu\text{M}$  TDZ- 0,05  $\mu\text{M}$  BAP.

Plants of *G. laciniata* obtained during *in vitro* establishment stage. From left side to right the plants correspond to the treatments 1) without growth regulators, 2) 0.1  $\mu\text{M}$  TDZ, 3) 0.05  $\mu\text{M}$  BAP and 4) 0.1  $\mu\text{M}$  TDZ- 0.05  $\mu\text{M}$  BAP.

Al analizar el número de brotes, número de nudos y número de raíces obtenidos por planta y la altura de planta, también se encontró una respuesta diferencial según la especie (tabla 2, pág. 167).

En *G. sp.* los tratamientos no afectaron el número de brotes y la altura de planta, mientras que los medios con BAP redujeron el número de nudos por planta y la presencia de TDZ disminuyó el número de raíces. En *G. laciniata* tanto el BAP como

el TDZ estimularon la formación de múltiples brotes, mientras que este efecto fue mayor en el medio con 0,1  $\mu\text{M}$  de TDZ. La presencia de este regulador disminuyó la altura de planta, efecto que se le atribuye a las citocininas y que se debe a una disminución del largo del entrenudo (16). La menor cantidad de nudos por planta se produjo en el medio con ambos reguladores. Finalmente la presencia de TDZ inhibió la formación de raíces. Este comportamiento ha sido reportado para varias citocininas y en diversas especies y se debería a un desbalance en la relación de concentración entre este regulador y las auxinas (10).

En *G. peruviana* no se observaron diferencias en número de brotes ni en altura de planta, no obstante la presencia de citocinina redujo al número de nudos de los explantes. El TDZ no afectó el número de explantes que enraizaron pero disminuyó el número de raíces por explante, siendo este comportamiento otra forma de manifestación de la inhibición del enraizamiento por parte de este regulador.

**Tabla 2.** Efecto del BAP y el TDZ sobre el número de brotes, altura, número de nudos y de raíces por planta, durante el establecimiento *in vitro* de *G. sp.*, *G. laciniata* y *G. peruviana*.

**Table 2.** Effect of BAP and TDZ in number of shoot, shoot length, number of nodes and number of roots per plant during *in vitro* establishment of *G. sp.*, *G. laciniata* y *G. peruviana*.

Especie	Reguladores del crecimiento		Número de brote	Altura (cm)	Número de nudos	Número de raíces
	BAP $\mu\text{M}$	TDZ $\mu\text{M}$				
<i>G. sp.</i>	0	0	1,6 a	5,4 a	6,9 a	3,9 a
	0	0,1	1,8 a	2,8 a	6,8 a	0,2 b
	0,05	0	1,3 a	5,2 a	5,4 ab	3,4 a
	0,05	0,1	1,5 a	3,1 a	4,8 b	0,1 b
<i>G. laciniata</i>	0	0	2,2 c	8,8 a	12,1 a	5,3 a
	0	0,1	4,8 a	4,5 b	14,3 a	0 c
	0,05	0	3,1 b	8,9 a	14,5 a	4,2 b
	0,05	0,1	3,2 b	3,5 b	8,7 b	0 c
<i>G. peruviana</i>	0	0	1,9 a	2,7 a	6,1 a	9,3 a
	0	0,1	1,8 a	2,3 a	4,1 b	7,9 b
	0,05	0	1,7 a	3,3 a	3,9 b	9,9 a
	0,05	0,1	1,6 a	2,5 a	3,6 b	5,9 bc

Letras distintas indican diferencias significativas para un  $p < 0,05$ .

## Multiplicación

Es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro* dado que es en ella donde se logra la verdadera multiplicación no sólo en cantidad sino también en su calidad genética ya que es la fase en la que se producen las variaciones somaclonales. Con respecto a la multiplicación en cantidad se busca obtener la tasa de multiplicación más alta y en el menor tiempo, utilizando el medio de cultivo más eficiente (10). Para mantener la calidad genética se trata de disminuir al máximo el contacto de los explantes con los reguladores del crecimiento y el número de sub cultivos (19).

El medio de cultivo de Murashige Skoog es el más ampliamente utilizado y en general se comporta satisfactoriamente en plantas herbáceas (9). Es bien conocido que en muchas especies la disminución en la concentración de sales favorece el enraizamiento (10).

Las especies de *Glandularia* utilizadas en este trabajo generalmente se encuentran en suelos pobres por lo que se trabajó bajo la hipótesis que crecerían bien en medios diluidos y que esta disminución en la concentración de sales favorecería el enraizamiento. El crecimiento y enraizamiento observado en el medio de cultivo de establecimiento sin reguladores indican un nivel endógeno adecuado para su multiplicación en un medio libre de los mismos, disminuyendo el riesgo potencial de la ocurrencia de variaciones somaclonales.

Otro componente del medio de cultivo que tiene especial relevancia es la sacarosa cuya función no es sólo la de ser fuente carbonada para sostener el crecimiento de las plantas *in vitro*, sino que interviene en distintos aspectos del crecimiento y desarrollo de las mismas, siendo estos efectos dependientes de la concentración utilizada (18).

En el presente trabajo la respuesta del porcentaje de explantes que crecieron y enraizaron en los distintos tratamientos fueron afectados por la especie. En *G. sp.* y en *G. laciniata* el aumento de la concentración de sacarosa disminuyó el porcentaje de explantes con crecimiento mientras que el porcentaje de plantas que enraizaron no se diferenció estadísticamente; en *G. peruviana* no se observaron efectos de los factores ensayados sobre estas variables (datos no presentados).

En la tabla 3 (pág. 169) se presentan los valores promedios de número de raíces, brotes y nudos totales por planta y la altura de las mismas para cada concentración de sales y de sacarosa.

En *G. sp.* la mayor dilución del medio basal aumentó el número de raíces y no afectó el número de brotes y nudos, no obstante la altura de la planta fue menor. El comportamiento observado en el medio más diluido estaría indicando una competencia por nutrientes entre la parte aérea y la raíz dando como resultado plantas achaparradas, aspecto que puede dificultar el repique al momento de obtener las estacas uninodales. La mayor concentración de azúcar favoreció la formación de un mayor número de raíces, mientras que no afectó el resto de las variables evaluadas.

En *G. laciniata* ni la concentración de sales ni la de sacarosa afectó el número de raíces mientras que el MS  $\frac{1}{2}$  y la menor concentración de sacarosa arrojó mejores resultados en cuanto a número de brotes, nudos y altura de la planta. *G. peruviana* se comportó en forma similar a *G. sp.*, afectándose además el número total de nudos en la mayor dilución del medio de cultivo.

La tasa de multiplicación determinada a los 30 días en el medio de cultivo MS  $\frac{1}{2}$  adicionado de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa fue de 6 para *G. sp.* y *G. peruviana* y de 4 para *G. laciniata*. Estos valores pueden considerarse aceptables y son similares a los obtenidos por Marino *et al.* (6) en *G. perakii*.



La aclimatación se consiguió con éxito en las tres especies. Cabe destacar que se observó una alta sensibilidad al exceso de humedad en el ambiente en *G. laciniata*, efecto que fue más pronunciado al inicio de la aclimatación (datos no presentados).

**Tabla 3.** Efecto de la concentración de sales y sacarosa en el número de raíces, brotes y nudos por planta y altura de las mismas durante la etapa de multiplicación *in vitro* de *G. sp.*, *G. laciniata* y *G. peruviana*.

**Table 3.** Effect of salts and sucrose concentration on number of roots, shoots and nodes per plant and shoot length during *in vitro* multiplication stage of *G. sp.*, *G. laciniata* y *G. peruviana*.

<b>G. sp.</b>	<b>N° raíces por planta</b>	<b>N° de brotes por planta</b>	<b>N° de nudos totales por planta</b>	<b>Altura de planta (cm)</b>
MS ½	3,8 b	1,7 a	6,3 a	6,1 a
MS ¼	7,2 a	1,6 a	5,6 a	4,4 b
20 g.L <sup>-1</sup>	4,7 b	1,7 a	6,0 a	5,3 a
40 g.L <sup>-1</sup>	6,2 a	1,6 a	5,9 a	5,2 a
MS x S (p value)	ns	ns	ns	0,009
<b>G. laciniata</b>	<b>N° raíces por planta</b>	<b>N° de brotes por planta</b>	<b>N° de nudos totales por planta</b>	<b>Altura de planta (cm)</b>
MS ½	2,4 a	1,6 a	3,9 a	2,0 a
MS ¼	3,0 a	1,2 b	2,6 b	1,2 b
20 g.L <sup>-1</sup>	2,7 a	1,6 a	3,9 a	1,9 a
40 g.L <sup>-1</sup>	2,7 a	1,2 b	2,6 b	1,3 b
MS x S (p value)	ns	0,017	0,042	Ns
<b>G. peruviana</b>	<b>N° raíces por planta</b>	<b>N° de brotes por planta</b>	<b>N° de nudos totales por planta</b>	<b>Altura de planta (cm)</b>
MS ½	5,2 b	1,3 a	5,3 a	6,1 a
MS ¼	6,5 a	1,3 a	4,4 b	4,2 b
20 g.L <sup>-1</sup>	5,1 b	1,3 a	5,0 a	5,5 a
40 g.L <sup>-1</sup>	6,7 a	1,3 a	4,7 a	4,8 a
MS x S (p value)	ns	ns	ns	ns

Letras distintas indican diferencias significativas para un  $p < 0,05$  y ns significa no significativo.

## CONCLUSIONES

Es posible establecer y micropropagar las especies de *Glandularia* evaluadas, en medios de cultivos simples, con tasas de propagación aceptables.

Si bien la respuesta a los distintos medios de cultivos utilizados en el establecimiento y multiplicación *in vitro* fue altamente dependiente de la especie se puede concluir que:

- El medio más eficiente para el establecimiento *in vitro* de las tres especies de *Glandularia* es Murashige Skoog con sales y vitaminas diluidas a la mitad sin adición de citocininas.
- El medio de cultivo más adecuado para la multiplicación a partir de estacas uninodales es MS ½ con 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa.

La disponibilidad de este protocolo sencillo y eficiente permitirá avanzar en el plan de mejoramiento de "glandularias nativas" a través de la poliploidización *in vitro*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Auer, C.; Motyka, V.; Brezinová, A.; Kamínek, M. 1999. Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Physiol. Plant.* 105:141-147.
2. Botta, S. N. 1993. Notas del género *Glandularia* (Verbenaceae-Verbenoide) III Estudio taxonómico de la especies patagónicas. *Parodiana.* 8(1): 9-33.
3. Dalmaso, A.; Candia, R.; Ganci, C. 2008. Xerijardinaería con especies nativas. Boletín de extensión Científica 6 p. 12. Fundación CRICYT. CONICET-IADIZA (CCT).
4. Escandón, A.; Alderete, L.; Hagiwara, J. 2007. *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. *Scientia Horticulturae* 115: 56-61.
5. Kataeva, N.; Alexandrova, I.; Butenko, R.; Dragavtceva, E. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.*, 27, 149-154.
6. Marino, C.; Ponce, M. T.; Videla, M.; Fioretti, S.; Cirrincione, M. 2003. Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae), a native species with ornamental potential. *Biocell.* 27(1): 57-60.
7. Múlgura, M. 1999. Verbenaceae. En: Zuloaga, F.; O. Morrone. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis. Vol. 74: 1136-1170.
8. Murashige, T. 1982. Regeneration of plant. *California Agriculture.* 36(8): 19-20.
9. \_\_\_\_\_, Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
10. Orellana Pérez, P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Pérez Ponce, J.N Ed. Santa Clara Cuba. Instituto de Biotecnología de las plantas. p. 151-177.
11. Passera, C. B.; Ambrosetti, J. A. 1999. *In vitro* propagation of "Incauyo", *Lippia integrifolia* (Gris.) Hier. (Verbenaceae), a medicinal and aromatic plant of monte phytogeographical province, Argentina. *Acta Horticulturae*, 502, 319-324.
12. Ponce, M. T.; Quiroga, M.; Peñafiel, L.; Beeskow, A. 2000. Micropropagación de *Junellia minutifolia* (Phil) Moldenke, especie nativa de la Patagonia Argentina. En Actas de la XXIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Río Cuarto. Córdoba: Asociación Argentina de Fisiología Vegetal. p. 130-131.
13. \_\_\_\_\_; Videla, E.; Fioretti, S.; Galat, E. 2006. Propagación de *Lecanophora heterophylla*. Especie nativa con potencial ornamental. *Rev. de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.* 38(2): 91-100.
14. San Martino, L.; Beeskow, A. 2006. Las especies patagónicas de *Glandularia*: un recurso potencial para el mejoramiento de variedades comerciales del género. En libro de resúmenes del III Congreso Argentino de Floricultura. La Plata, 7 al 10 de noviembre de 2006. p. 314-317.
15. Schnack, B.; Covas, G. 1945. Hibridación interespecífica en *Glandularia* (Verbenaceae). *Darwiniana* 7(1): 71-79.
16. Staden, J.; Zazimalova, E.; George, E. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George, E.; Hall, M. & Klerk, G.-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Cultur.* p. 205-226.
17. Stancanelli, S.; Imhof, L.; Facciuto, G. 2010. Avances en el mejoramiento de *Glandularia*: caracterización de clones selectos para la formación de una serie. En libro de resúmenes del V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Concordia. Entre Ríos, Argentina, 2 al 5 de Noviembre de 2010. p. 259-260.
18. Todorović, S.; Grubišić, D.; Giba, Z.; Mišić, D.; Konjević, R. 2006. Sucrose effects on *in vitro* fruiting and seed production of *Centaureum pulchellum*. *Biol. Plant.* 50(4): 771-774.