



MICROPROPAGACIÓN DE *ANREDERA CORDIFOLIA* (BASELLACEAE)

MICROPROPAGATION OF *ANREDERA CORDIFOLIA* (BASELLACEAE)

Silvia C. Schaller^{1,2}, Natalia R. Dolce^{1,2}, Luis A. Mroginski² & Ricardo D. Medina^{1,2*}

1. Instituto de Botánica del Nordeste (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad Nacional del Nordeste), Corrientes, Argentina
2. Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Nordeste), Corrientes, Argentina

*ricardomedina@agr.unne.edu.ar

Citar este artículo

SCHALLER, S. C., N. R. DOLCE, L. A. MROGINSKI & R. D. MEDINA. 2024. Micropropagación de *Anredera cordifolia* (Basellaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 59: 493-506.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v59.n4.44826>

Recibido: 23 Abr 2024
Aceptado: 16 Ago 2024
Publicado en línea: 10 Dic 2024
Publicado impreso: 31 Dic 2024
Editor: Federico P. O. Mollard

ISSN versión impresa 0373-580X
ISSN versión on-line 1851-2372

SUMMARY

Background and aims: *Anredera cordifolia* is a scandent plant of the Basellaceae family, with wide nutritional and medicinal potential. The aim of this work was to develop an efficient micropropagation protocol for this species, considering the stages of disinfection of the explants for their establishment and *in vitro* multiplication, as well as the acclimatization of the regenerated plants.

M&M: Different factors affecting the different stages of the micropropagation process were analyzed. For disinfection, the concentration of active Cl was evaluated in combination or not with a H₂O₂ pre-treatment. For multiplication, different dilutions of the Murashige and Skoog (MS) basal medium were tested in 4 accessions of distinct geographical origin. In the acclimatization stage, the survival of the regenerated plants from the different *in vitro* multiplication treatments was evaluated.

Results: For disinfection, the concentration of active Cl that stood out in obtaining aseptic cultures of explants that regenerated plants was 1.7%, not requiring a pre-treatment with H₂O₂. Considering the results obtained in the *in vitro* multiplication and acclimatization stages, it was determined that the use of MS diluted to a quarter of its concentration led to high percentages of plant regeneration, high rates of node formation and greater *ex vitro* survival rate compared to the other dilutions.

Conclusion: This work constitutes the first report on the micropropagation of *A. cordifolia*. This contribution is crucial for the implementation of an efficient large-scale propagation system and the development of germplasm conservation methodologies.

KEY WORDS

Anredera cordifolia, acclimatization, biotechnology, tissue culture, *in vitro* propagation.

RESUMEN

Introducción y Objetivos: *Anredera cordifolia* (Basellaceae) es una planta escandente con amplio potencial alimenticio y medicinal. El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo eficiente de micropropagación para esta especie, contemplando las etapas de desinfección de los explantes para su establecimiento y multiplicación *in vitro*, así como la aclimatación de las plantas regeneradas.

M&M: Se analizaron diferentes factores que afectan las distintas etapas del proceso de micropropagación. Para la desinfección se evaluó la concentración de Cl activo en combinación o no con un pretratamiento de H₂O₂. Para la multiplicación se probaron diferentes diluciones del medio basal de Murashige y Skoog (MS) en 4 accesiones de diferente procedencia geográfica. En la etapa de aclimatación se evaluó la sobrevivencia de las plantas regeneradas provenientes de los distintos tratamientos de multiplicación *in vitro*.

Resultados: Para la desinfección, la concentración de Cl activo que se destacó en la obtención de cultivos asépticos de explantes que regeneraron plantas fue 1,7%, no siendo necesario el pretratamiento con H₂O₂. Considerando los resultados obtenidos en las etapas de multiplicación *in vitro* y aclimatación, se determinó que el uso del MS diluido a un cuarto de su concentración propició porcentajes altos de regeneración de plantas, tasas altas de formación de nudos y la mayor supervivencia *ex vitro* respecto de las restantes diluciones.

Conclusión: Este trabajo constituye el primer reporte sobre la micropropagación de *A. cordifolia*. Esta contribución resulta crucial para la implementación de un sistema eficiente de propagación a gran escala y el desarrollo de metodologías de conservación de germoplasma.

PALABRAS CLAVE

Anredera cordifolia, aclimatación, biotecnología, cultivo de tejidos, propagación *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de nuevas especies en busca de compuestos útiles relacionados con la alimentación y el cuidado de la salud se ha convertido en la guía para los investigadores de la industria alimentaria y farmacéutica (Goicochea *et al.*, 2020). En relación con ello, *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (Basellaceae), conocida como enredadera papa, parra de madeira, potato vine, insulina, zarzaparrilla (Vivian-Smith *et al.*, 2007; Piñeros *et al.*, 2019) ha sido estudiada tanto por sus propiedades alimenticias como medicinales. Esta especie es nativa de regiones tropicales y subtropicales de América del Sur y ahora se encuentra ampliamente distribuida en regiones de climas templados suaves en todo el mundo (Vivian-Smith *et al.*, 2007). Es una planta voluble de hojas simples, suculentas, cordadas (Fig. 1A-B), de tallos rojizos en la región apical y marrón verdoso en las partes más basales de los tallos que produce tubérculos aéreos (Fig. 1C) y rizomas de tamaño variado; además presenta inflorescencias terminales con flores hermafroditas (Fig. 1D) (Vivian-Smith *et al.*, 2007). Tanto la formación de frutos como la producción de semillas en esta especie es ocasional y raramente citada (Xifreda *et al.*, 1999). Mediante estudios citogenéticos, se identificó una subespecie triploide que forma granos de polen anormales, provocando la esterilidad en algunas poblaciones (Xifreda *et al.*, 1999). Esta sería una de las razones por la que la producción de los tubérculos aéreos y rizomas representaría la estrategia natural que permite la propagación de esta especie (San Gregorio *et al.*, 2021).

En la bibliografía se han reportado estudios referentes al uso de *A. cordifolia* como producto con potencial alimenticio humano o animal (Kinupp *et al.*, 2004; Kusumanti & Sugiharto, 2017; Alba *et al.*, 2020) y fitoterapéutico debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antidiabéticas, antihipertensivas, vasodilatadoras, diuréticas, antiobesidad, hipolipidémicas, antioxidantes, gastroprotectoras, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, analgésicas y cicatrizantes de heridas (Djamil *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014; Widyarini *et al.*, 2015; Garmana *et al.*, 2016; Leliqia *et al.*, 2017; Nasution *et al.*, 2020). En relación a esto, se ha investigado acerca de sus componentes químicos, en particular la presencia

de saponinas, terpenos, alcaloides y flavonoides, su aislamiento, producción y utilización en la industria farmacéutica (Sukandar *et al.*, 2011; Djamil *et al.*, 2012; Leliqia *et al.*, 2017; Kusumanti & Sugiharto, 2017), así como la caracterización de diferentes accesiones de esta especie respecto de sus patrones enzimáticos y su contenido en bioactivos (Pitoyo *et al.*, 2019). La identificación quimiotaxonómica de materiales, de acuerdo con sus componentes de interés, y la disponibilidad de procedimientos que permitan la clonación eficaz de esos genotipos selectos mediante el desarrollo de sistemas de propagación *in vitro*, serán de gran importancia para asistir a futuros programas de fitomejoramiento (Hasanah & Mawarni, 2020).

Considerando el potencial de esta especie respecto de sus compuestos químicos de interés, es de esperar que se incremente la demanda de material vegetal de *A. cordifolia* para su explotación (Alba *et al.*, 2020). Afortunadamente, la Biotecnología aporta herramientas para el establecimiento de un protocolo de propagación clonal de genotipos selectos, incluso su conservación de manera segura y eficaz. En relación con ello, en la familia Basellaceae se reportan trabajos publicados que tratan del cultivo *in vitro* para la propagación y multiplicación de *Basella alba* L., *B. rubra* L. y *Ullucus tuberosus* Caldas (Jordan *et al.*, 2002; Manzelli *et al.*, 2004; Shekhawat & Manokari, 2016; Abubacker *et al.*, 2019; Kumar & Giridhar, 2021), y el mejoramiento y conservación de ejemplares selectos de *U. tuberosus* (Viehmánová *et al.*, 2012; Arizaga *et al.*, 2017; Hammond Hammond *et al.*, 2019). Hasta el momento, lo único informado acerca del cultivo *in vitro* de *A. cordifolia*, trata de la inducción de callos a partir de segmentos foliares y nodales para la síntesis de bioactivos mediante la utilización de reguladores de crecimiento vegetal (Sugiyarto & Kuswandi, 2014; Junairiah *et al.*, 2023).

Por lo expuesto, resulta preciso generar información sobre el establecimiento de un protocolo de micropropagación de *A. cordifolia*, que permita la multiplicación clonal de genotipos selectos, indispensable si se requiere escalar la propagación de determinados quimiotipos promisorios, carácter que depende del perfil de bioactivos de cada accesión (Benomari *et al.*, 2023).

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo eficiente de micropropagación de *A.*

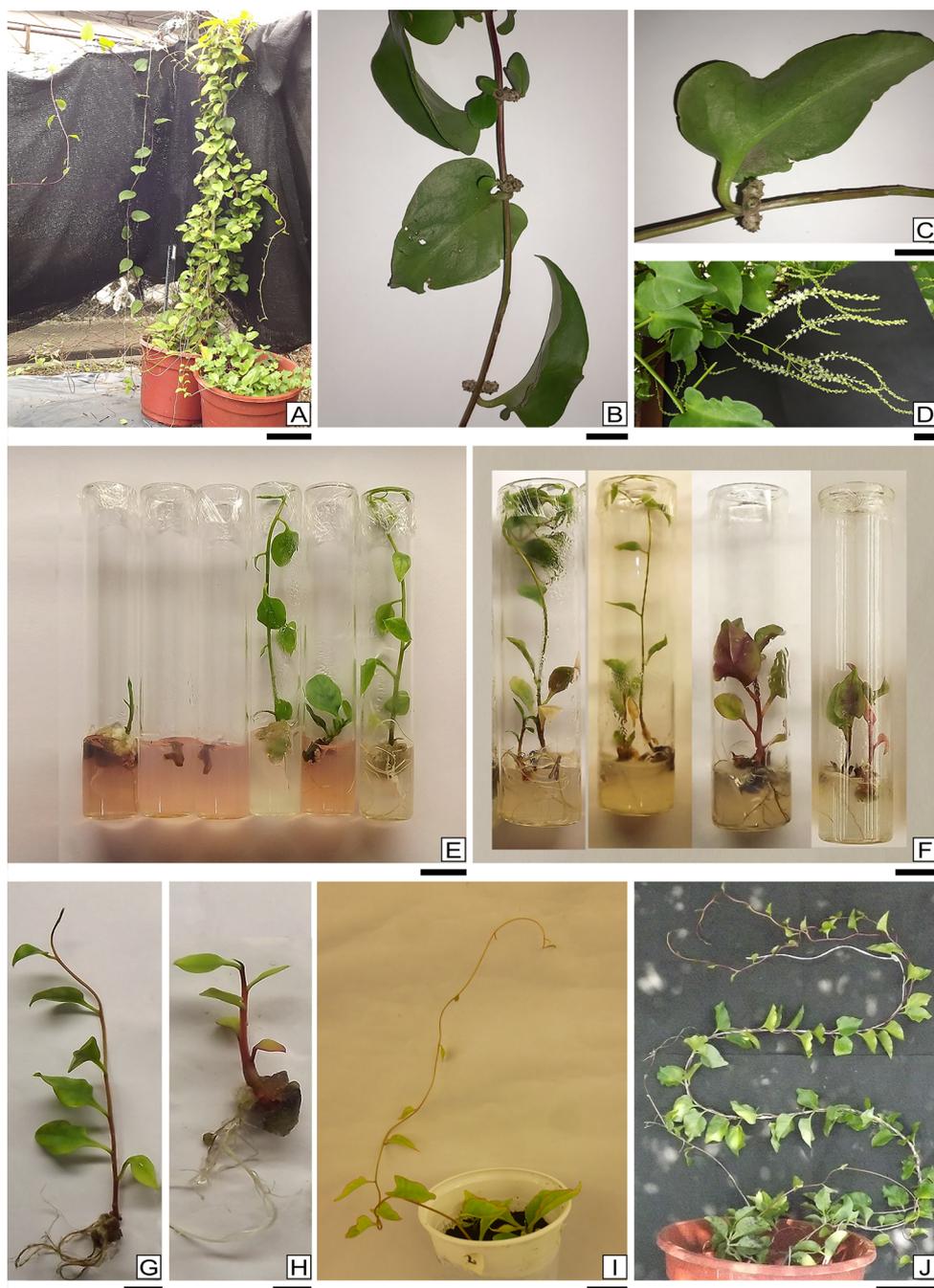


Fig. 1. Micropropagación de *Anredera cordifolia*. **A:** Plantas cultivadas en maceta y a la intemperie en Corrientes Capital. **B:** Tallo voluble con hojas simples y cordadas. **C:** Tubérculo aéreo en la axila de una hoja. **D:** Rama florífera. **E:** Respuestas obtenidas *in vitro*, luego de la desinfección con 1,7 % Cl activo y establecimiento en el medio basal MS luego de 30 días de cultivo. **F:** Plantas regeneradas *in vitro* luego de 30 días (de izquierda a derecha: en medio basal MS en su concentración original, diluido al 1/2, 1/4 y 1/8). **G-H:** Plantas regeneradas *in vitro* en MS y en MS diluido al 1/4 a los 30 d de cultivo, respectivamente. **I-J:** Plantas aclimatadas en invernadero a los 60 días y 120 días de su trasplante, respectivamente. Escalas= A, J: 10 cm; B, D: 2 cm; C, E-I: 1 cm.

cordifolia, contemplando las etapas de desinfección de los explantes para su establecimiento y multiplicación *in vitro*, así como la aclimatación de las plantas regeneradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron ramas de *A. cordifolia* crecidas en áreas naturales de 4 procedencias geográficas situadas en diferentes provincias argentinas. Las ramas recolectadas fueron seccionadas en esquejes de 15-20 cm (incluyendo al menos 3 nudos), cultivadas en macetas con sustrato comercial (Sunshine Mix#6, Florensa ®) y mantenidas en los jardines de la cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste y del área homónima del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE CONICET-UNNE), Corrientes, Argentina (27°27'29,40"S 58°49'18,25"O). De esta manera, se obtuvieron plantas que florecieron y fueron herborizadas para su identificación. Todos los materiales fueron depositados en el Herbario CTES del IBONE (CONICET-UNNE), provenientes de las localidades de Colonia Liebig (N°1-I / CTES0060162, 27°54'38"S 55°49'36"O) y Corrientes Capital (N°5 / CTES0060290, 27°27'57,3"S 58°49'19,4"O), provincia de Corrientes; Ingeniero Chanourdié (N°3 / CTES0060289, 28°45'31,12"S 59°34'34,58"O), provincia de Santa Fe; y Resistencia (N°2-I / CTES0060288, 27°26'18"S 59°00'16,8"O), provincia del Chaco, Argentina.

Desinfección y establecimiento in vitro

En el ensayo experimental de desinfección del material vegetal se trabajó con la accesión proveniente de Colonia Liebig, Corrientes. Para ello, se tomaron ramas de las plantas crecidas en maceta, las cuales se cortaron en segmentos multinodales de 3 a 4 nudos que fueron enjuagados exhaustivamente con agua corriente y posteriormente sumergidos en etanol al 70% por 1 min. Se evaluaron dos formas de desinfección del material vegetal: 1) los segmentos multinodales se transfirieron a distintas concentraciones de solución de hipoclorito de sodio comprendiendo 1,1; 1,4; 1,7 y 2 % Cl activo, cada una con 1 gota de Triton-X-100 por cada 100 ml de solución durante 30 min con

agitación manual discontinua; 2) se incluyó un pretratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 10 vol.) durante 15 min, previo a la sumersión del material vegetal en las soluciones de hipoclorito de sodio más Triton-X-100, tal como se describiera anteriormente.

Finalmente, los segmentos multinodales de todos los tratamientos se enjuagaron 3 veces con agua bidestilada estéril. A continuación, en cabina de flujo laminar, se cultivaron segmentos uninodales de 1 cm de longitud en tubos de vidrio (ca. 50 cm³) con 10 ml de medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH y/o HCl y se solidificó con 0,75% de Agar Sigma Aldrich A-1296. Los tubos fueron esterilizados en autoclave a 1 atmósfera de presión (120 °C) durante 20 min. La incubación se realizó en cámara climatizada a 27±2 °C con un fotoperíodo de 14 h y una irradiancia PAR de 116 μmol.m⁻²s⁻¹. Para determinar la efectividad de los tratamientos de desinfección en el establecimiento aséptico de los cultivos y la regeneración de plantas, a los 30 días se registraron datos de las distintas respuestas morfogénicas obtenidas: explantes sin respuesta, explantes contaminados con hongos o con bacterias y explantes con vástago y raíces, es decir, que regeneraron plantas. Las plantas regeneradas *in vitro* permanecieron en la cámara climatizada conformando una colección de trabajo y a la vez un banco de germoplasma activo, siendo mantenidas a través de subcultivos que fueron renovados cada 3 meses.

El establecimiento *in vitro* del resto de las accesiones (Corrientes Capital, Ingeniero Chanourdié y Resistencia) se realizó siguiendo el protocolo de desinfección que comprendió una sumersión en etanol al 70% por 1 min posterior transferencia a una solución de hipoclorito de sodio con 1,7% Cl activo, con 1 gota de Triton-X-100 por cada 100 ml de solución durante 30 min y 3 enjuagues con agua bidestilada estéril, previamente probado de forma experimental con la accesión de Colonia Liebig.

Multiplicación in vitro

Con el fin de evaluar la capacidad de multiplicación *in vitro* de *A. cordifolia*, se cultivaron segmentos uninodales provenientes de plantas de las 4 procedencias geográficas mencionadas anteriormente (Colonia Liebig, Corrientes Capital,

Ingeniero Chanourdié y Resistencia), las cuales fueron mantenidas en medio basal MS sin la adición de reguladores de crecimiento vegetal. Los medios de cultivo evaluados para la multiplicación consistieron en distintas concentraciones del medio basal MS (*i.e.* MS en su concentración original o diluido al 1/2, 1/4 y 1/8), todos compensados a 3% de sacarosa y solidificados con 0,75% de Agar Sigma Aldrich A-1296. La incubación se realizó en cámara de cultivo a 27 ± 2 °C y 14 h de fotoperíodo ($116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiancia). A los 30 días de cultivo, se registró el porcentaje de explantes que regeneraron plantas (*i.e.* regeneración *in vitro* de plantas), el número de nudos por explante y la longitud del vástago regenerado por tratamiento. Para la evaluación del crecimiento, se pesaron en fresco las plantas regeneradas *in vitro* en los distintos tratamientos y posteriormente se secaron en estufa a 70 °C hasta peso constante para determinar su peso seco.

Aclimatación

Para evaluar la capacidad de aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro* se emplearon plantas obtenidas luego de 30 d del cultivo de los segmentos uninodales provenientes de los distintos tratamientos del ensayo de multiplicación. Las plantas fueron extraídas de los tubos, lavadas cuidadosamente con agua corriente para sacar el medio de cultivo remanente en las raíces, posteriormente tratadas con una solución de Carbendazim ($2 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$) durante 20 min y finalmente transferidas a macetas de 180 cm^3 conteniendo sustrato comercial (Sunshine Mix#6, Florensa®). Las plantas cultivadas en maceta fueron llevadas a un invernadero y embolsadas individualmente, a modo de cámara húmeda, siendo sometidas a apertura y cierre diarios de la bolsa durante 3 semanas hasta su retiro completo. Al cabo de 60 días de la transferencia a las condiciones de crecimiento en el invernadero, se evaluó la supervivencia *ex vitro*. Para ello, se contabilizó el número de plantas que superaron la fase de aclimatación, lo cual se expresó como porcentaje de plantas aclimatadas.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental empleado en la evaluación de la desinfección fue completamente aleatorizado (1 accesión procedente de Colonia Liebig x 8 tratamientos de desinfección), con 3 repeticiones

de 10 explantes cada una para cada tratamiento. En cuanto a la evaluación de la multiplicación *in vitro* y la aclimatación, el diseño experimental fue factorial, cuyos factores principales fueron el factor medio de cultivo (4 niveles) *versus* el factor procedencia de las accesiones (4 niveles). Cada tratamiento fue repetido 3 veces, con 10 explantes por cada repetición.

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017), previa verificación de la normalidad de las variables. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas, se compararon las medias aritméticas de las variables evaluadas, mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Desinfección y establecimiento in vitro

En las Figuras 1E y 2 pueden observarse las respuestas obtenidas luego de la aplicación de diferentes tratamientos de desinfección y el subsecuente cultivo *in vitro* de explantes uninodales de *A. cordifolia*, proveniente de Colonia Liebig, al cabo de 30 días. Si bien en todos los tratamientos se observaron explantes contaminados con hongos o con bacterias, la contaminación fúngica en todos los casos fue mayor que la producida por bacterias. Además, se evidenció que el porcentaje de explantes contaminados, debido a hongos y bacterias en forma conjunta, fue variable de acuerdo al tratamiento (Fig. 2). Asimismo, fue posible la obtención de explantes que no presentaban contaminación, aquellos que no exhibían actividad morfogénica o denominados sin respuesta y aquellos que formaron vástago y raíces. Con respecto a los tratamientos, se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de explantes con vástago y raíces relacionadas con la concentración de Cl activo y no al pretratamiento con H_2O_2 . De acuerdo con los resultados, la concentración de Cl activo que se destacó en la obtención de cultivos asépticos de explantes que regeneraron plantas fue 1,7%, no siendo necesario el pretratamiento de los explantes con H_2O_2 .

Multiplicación in vitro

Independientemente de la dilución del medio MS empleado y las accesiones evaluadas mediante

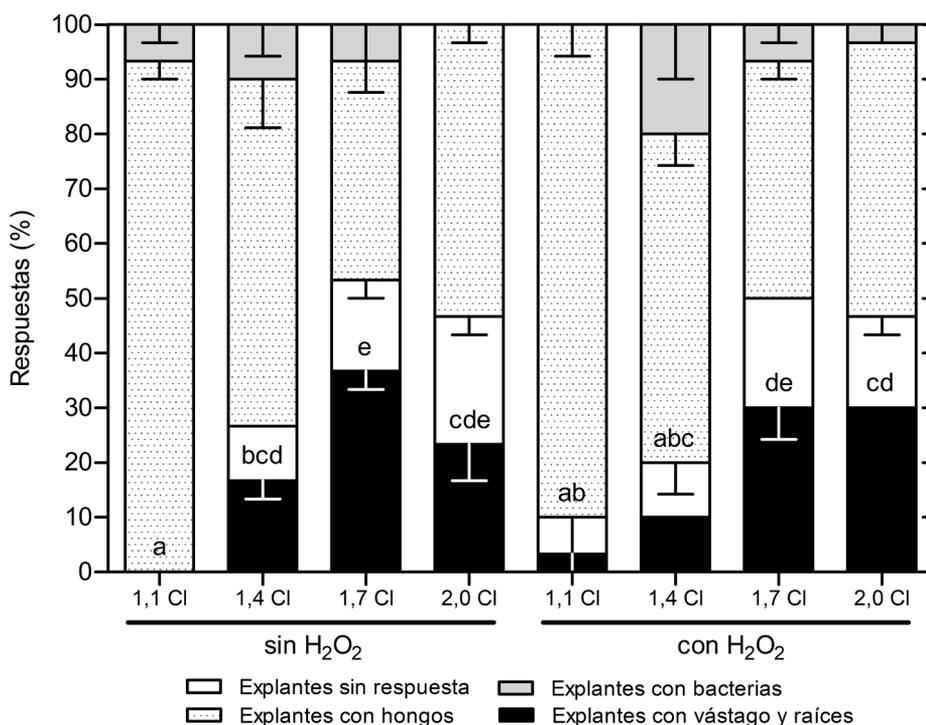


Fig. 2. Evaluación del efecto de los tratamientos de desinfección en explantes nodales de *A. cordifolia* cultivados *in vitro*. Letras distintas indican diferencias significativas en el porcentaje de explantes con vástago y raíces según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

el cultivo *in vitro* de explantes uninodales de *A. cordifolia*, se ha evidenciado en todos los casos más del 80 % de explantes que formaron plantas (Fig. 3A). En términos generales, en los medios de cultivo cuya concentración del MS se encontraba más diluida se manifestaron los mayores porcentajes de regeneración de plantas en cada una de las accesiones estudiadas; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P = 0,066$).

Por otra parte, en todas las accesiones evaluadas se observó un efecto positivo del medio basal MS en su concentración original sobre la tasa de multiplicación *in vitro*, representada por el número de nudos por explante (Fig. 1F y Fig. 3B) ($P < 0,0001$). Asimismo, en cada una de las accesiones se denotó una disminución progresiva de la multiplicación *in vitro* en función de la dilución del medio de cultivo ensayado.

En relación con la longitud del vástago, en general, se evidenció un comportamiento similar al observado en el número de nudos por explante. La

longitud del vástago también disminuyó en función de la dilución del medio de cultivo ensayado (Fig. 1F-H y Fig. 3C). En las 4 accesiones, el MS en su concentración original fue el que propició la mayor longitud del vástago ($P < 0,005$).

El análisis del efecto de la interacción entre la concentración del medio basal y la procedencia de las accesiones no evidenció diferencias significativas en relación al peso fresco ($P = 0,446$) y peso seco ($P = 0,062$) de las plantas regeneradas *in vitro* de *A. cordifolia* (Tabla 1). No obstante, la evaluación de los efectos simples de la concentración del medio basal y de la procedencia ha arrojado diferencias estadísticas significativas en el peso fresco y seco de las plantas *in vitro*. En ambos casos, tanto el peso fresco como el peso seco de las plantas regeneradas *in vitro* disminuyeron en función de la dilución del medio basal ($P < 0,0001$). Con respecto a la procedencia, las plantas de menor peso fresco y seco fueron las derivadas del material proveniente de Resistencia y las de mayor peso fresco las oriundas de Ingeniero Chanourdié ($P < 0,0001$).

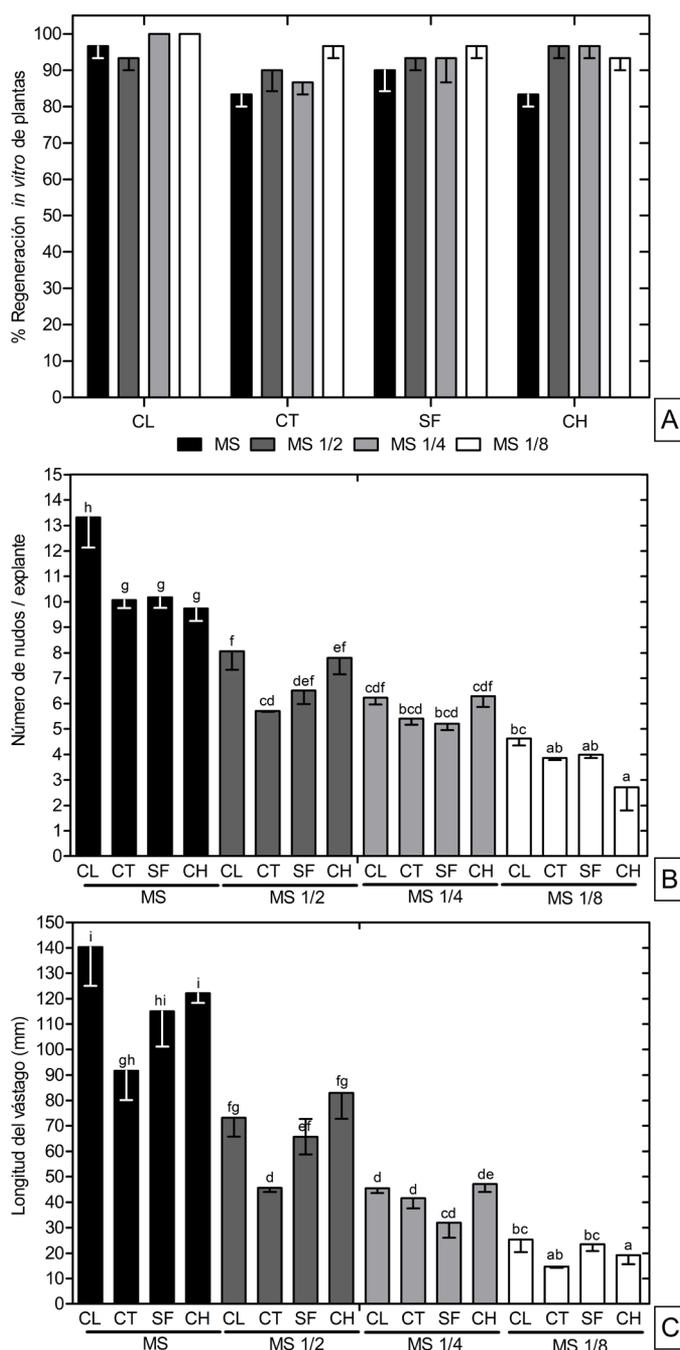


Fig. 3. Evaluación del efecto de las diluciones del medio de cultivo y de diferentes accesiones de *A. cordifolia* sobre la multiplicación *in vitro* al cabo de 30 días. **A:** Regeneración *in vitro* de plantas (%). **B:** Número de nudos por explante. **C:** Longitud del vástago de las plantas regeneradas (mm). En B y C, las letras distintas indican diferencias significativas según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$) entre tratamientos. Abreviaturas = CL: acción proveniente de Colonia Liebig, Corrientes; CT: acción proveniente de Corrientes Capital; SF: acción proveniente de Ingeniero Chanourdié, Santa Fe; CH: acción proveniente de Resistencia, Chaco; MS: medio basal de Murashige y Skoog (1962) y sus diluciones al 1/2, 1/4 y 1/8.

Tabla 1. Evaluación del efecto de las diluciones del medio de cultivo y de las diferentes accesiones de *A. cordifolia* sobre el peso fresco y seco (mg) de las plantas regeneradas *in vitro*. Letras distintas en los efectos simples de la dilución del medio de cultivo y la procedencia de las accesiones, indican diferencias significativas según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Concentración del medio basal	Peso fresco (mg)					Peso seco (mg)				
	Procedencia				Efecto Dilución	Procedencia				Efecto Dilución
	CL	CT	SF	CH		CL	CT	SF	CH	
MS	1105,9	860,9	1224,1	1095,7	1071,6 a	85,2	83,4	91,8	78,9	84,8 a
MS 1/2	941,7	811,6	1022,1	692,9	867,0 b	75,5	67,3	83,7	59,3	71,4 b
MS 1/4	707,7	760,5	823,2	361,5	663,2 c	60,4	69,6	62,3	31,5	55,9 c
MS 1/8	505,1	529,6	548,2	327,8	477,6 d	46,5	47,1	43,5	27,9	41,3 d
Efecto de la Procedencia	815,1 b	799,3 b	904,4 a	560,8 c	--	66,9 a	66,8 a	70,3 a	49,4 b	--

Referencias: CL: accesión proveniente de Colonia Liebig, Corrientes; CT: accesión proveniente de Corrientes Capital; SF: accesión proveniente de Ingeniero Chanourdié, Santa Fe; CH: accesión proveniente de Resistencia, Chaco; MS: medio basal de Murashige y Skoog (1962) y sus diluciones al 1/2, 1/4 y 1/8.

Aclimatación

En la Fig. II se puede observar una planta regenerada *in vitro* y aclimatada de *A. cordifolia* luego de 60 días de la transferencia a las condiciones de crecimiento en el invernadero. En la Fig. 4

se presentan los resultados obtenidos luego de la aclimatación de las plantas regeneradas. A diferencia de lo observado en la multiplicación *in vitro*, la aclimatación demostró mayor éxito en relación con la supervivencia cuando las plantas

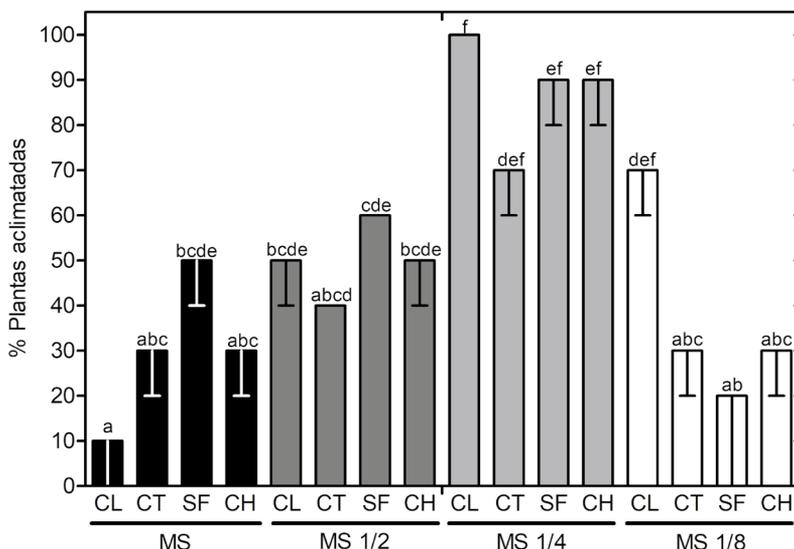


Fig. 4. Evaluación del efecto de las diluciones del medio de cultivo y de diferentes accesiones de *A. cordifolia* sobre el porcentaje de plantas aclimatadas al cabo de 60 días de su transferencia a condiciones *ex vitro*. Letras distintas indican diferencias significativas según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$). Abreviaturas = CL: accesión proveniente de Colonia Liebig, Corrientes; CT: accesión proveniente de Corrientes Capital; SF: accesión proveniente de Ingeniero Chanourdié, Santa Fe; CH: accesión proveniente de Resistencia, Chaco; MS: medio basal de Murashige y Skoog (1962) y sus diluciones al 1/2, 1/4 y 1/8.

derivaban de medios diluidos hasta un cuarto de la concentración original del medio basal MS (MS 1/4) ($P \leq 0,05$). A los 120 d de su transferencia, las plantas aclimatadas manifestaron un crecimiento vigoroso por lo que fueron trasplantadas a macetas de mayor tamaño (Fig. 1J).

DISCUSIÓN

Establecimiento in vitro

La desinfección del material vegetal es un requisito fundamental para el éxito de la micropropagación y, aunque parezca un simple paso de la fase de establecimiento, en algunas especies resulta dificultosa, siendo su propósito principal eliminar los contaminantes sin perjuicio de la actividad biológica del explante (Cuba-Díaz *et al.*, 2020; Gammoudi *et al.*, 2022). Por esta razón, en este trabajo se diseñó un experimento que nos permitiera establecer un procedimiento para la obtención de material vegetal aséptico, capaz de regenerar plantas *in vitro* de *A. cordifolia*.

Gammoudi *et al.* (2022), trabajando con semillas de pistacho (*Pistacia vera* L., Anacardiaceae), determinaron que la aplicación de $HgCl_2$ o H_2O_2 mostraron en promedio 100 y 83,9% de eficiencia de la desinfección, respectivamente, significativamente mayor que el obtenido con NaClO (en promedio 57,4%). Sin embargo, el NaClO fue el desinfectante que presentó menor porcentaje de efecto negativo sobre los tejidos (en promedio 2,4%) y, por lo tanto, sobre la posterior capacidad de regeneración de plantas, respecto del resto de los tratamientos (en promedio 21,2% para H_2O_2 y 62,8% para $HgCl_2$).

Otro aspecto a considerar en el desarrollo de un protocolo eficiente de desinfección es la forma de aplicación de los agentes desinfectantes. Por ejemplo, en *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) se comprobó que el uso de una mayor concentración de NaClO (1,3% Cl activo) en agitación constante por 60 min resultó mejor en el establecimiento aséptico de los explantes en relación a los restantes tratamientos con menores concentraciones del desinfectante y tiempos de agitación (Lazo-Javalera *et al.*, 2016). En *Vanilla planifolia* Jacks. (Orchidaceae), la utilización de NaClO en una concentración de 5% de Cl activo durante 25 min fue el tratamiento que permitió el mayor porcentaje de desinfección, pero

con agitación discontinua (Ayele & Tefera, 2018). En ambos trabajos se observó que el aumento en la concentración de NaClO produjo mejoras en la desinfección, ya sea con agitación continua o discontinua, acompañado de un aumento del efecto desinfectante al incrementar el tiempo de exposición. Por ello, resulta indispensable analizar el poder desinfectante de diferentes productos, sus concentraciones, combinaciones o métodos de aplicación, además de sus efectos sobre la actividad morfológica del explante. En el presente trabajo, para evitar una mayor agresión a los explantes, obtener cultivos asépticos y permitir que fueran capaces de regenerar plantas, se seleccionó el tratamiento que comprendió una sumersión de los explantes en una solución de NaClO con 1,7% de Cl activo con agitación discontinua, sin pretratamiento con H_2O_2 , lo que se aplicó al resto de accesiones de *A. cordifolia* como protocolo de desinfección para su establecimiento *in vitro*.

Multiplicación in vitro

La regeneración *in vitro* de plantas en otras especies de la familia Basellaceae involucró el uso del medio basal MS en su composición original adicionado con reguladores de crecimiento. Tal es el caso de *Basella alba*, *B. rubra* (Shekhawat & Manokari, 2016; Kumar & Giridhar, 2021) y *U. tuberosus* (Jordan *et al.*, 2002). Asimismo, en *A. cordifolia*, se ha empleado MS con reguladores de crecimiento, aunque con el fin de producir callos a partir de segmentos nodales (Junairiah *et al.*, 2023). A los fines de la micropropagación clonal, la vía de regeneración indirecta no es la apropiada por el riesgo que representa el desarrollo de yemas *de novo* que podrían resultar en variantes somaclonales (Heydari & Chamani, 2022). Además, se ha evidenciado que los callos ejercen un efecto negativo en la supervivencia de la yema axilar del segmento uninodal y su posterior conversión en vástago, como se observó en *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) (Medina *et al.*, 2017). Si bien, en plantas regeneradas *in vitro* de *Lippia integrifolia* (Gris.) Hieron. (Verbenaceae) por organogénesis indirecta y directa, se ha demostrado que se producen variantes somaclonales, hay consenso en que la micropropagación basada en la brotación de yemas axilares y subsecuente formación de vástagos, es el sistema más adecuado para garantizar la estabilidad genética y por ello

el más utilizado (Iannicelli *et al.*, 2016). Por esta razón, en el presente trabajo se eligió propiciar la organogénesis directa mediante el cultivo de explantes uninodales que sean capaces de regenerar plantas por la brotación de sus yemas axilares preexistentes en un medio nutritivo desprovisto de reguladores de crecimiento y de esta manera, mantener su identidad genética.

Acerca de la evaluación del efecto de las diluciones del medio basal MS sobre la multiplicación *in vitro* en *A. cordifolia* no se tienen referencias previas, ni en otras especies de Basellaceae. Sí se ha informado que la multiplicación *in vitro* en *B. rubra* y *U. tuberosus* mejora con la adición de reguladores de crecimiento al medio basal MS (Jordan *et al.*, 2002; Kumar & Giridhar, 2021). Dado que Junairiah *et al.* (2023) evidenciaron que al someter segmentos nodales de *A. cordifolia* a medios con reguladores de crecimiento los mismos forman callos, para evitar su masiva proliferación y que por ello se altere la formación de nudos, se decidió evaluar la respuesta de los explantes frente al cultivo en medio basal MS en su composición original y sus diluciones, sin reguladores de crecimiento. Considerando las diferentes diluciones (*i.e.* MS completo o diluido al 1/2, 1/4 y 1/8) y las distintas procedencias de las accesiones de *A. cordifolia* evaluadas, se promovió la formación de nuevos nudos por explante. Asimismo, se denotó una disminución gradual de la formación de nudos en función de la reducción de la concentración del medio basal, independientemente de la accesión. *A priori*, estos resultados condujeron a pensar que la concentración ideal para la multiplicación *in vitro* de *A. cordifolia* era la del MS completo para todas las accesiones. Sin embargo, en esta fase del proceso de micropropagación aún se desconocía el comportamiento de las plantas *in vitro* frente a la aclimatación.

En *Billbergia zebrina* (Herb.) Lindl. (Bromeliaceae) se observó que el incremento de la concentración del medio MS ejerció un efecto positivo en la multiplicación *in vitro* (Martins *et al.*, 2015). En *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae), la brotación *in vitro* de explantes uninodales con la subsecuente formación de nudos, se vio favorecida por la disminución de la concentración del medio basal MS y perjudicada por el aumento de la misma, resultando óptima la dilución MS 1/4 con la compensación de la sacarosa al 3% (Mroginski *et al.*, 1997).

En cuanto al efecto del medio basal sobre la longitud de las plantas regeneradas *in vitro*, en *Basella* sp. y *U. tuberosus*, se obtuvieron vástagos únicos de mayor altura en MS, a diferencia de aquellos medios que involucraron la adición de reguladores de crecimiento, que promovieron la formación de múltiples vástagos de menor tamaño (Jordan *et al.*, 2002; Shekhawat & Manokari, 2016; Kumar & Giridhar, 2021). Sin embargo, en estos trabajos no se evaluaron diluciones del medio basal en combinación o no con reguladores de crecimiento. En el bambú (*Oxytenanthera abyssinica* A. Rich. Munro, Poaceae), se demostró que el MS promovió la mayor elongación de los vástagos con respecto a sus diluciones (MS 1/2 o 1/4) sin reguladores de crecimiento (Diab & Mohamed, 2008).

Referido al efecto de las diluciones del medio basal MS sobre el peso fresco y seco de las plantas regeneradas *in vitro*, en *B. zebrina* (Bromeliaceae) se observó que su cultivo en MS en concentraciones superiores a la original (150% y 200%) mejoró significativamente su peso fresco y seco (Martins *et al.*, 2015). En *Typhonium flageliforme* (Lodd.) Blume (Araceae), también se registró un incremento del crecimiento, representado por el peso fresco y seco de las plantas regeneradas *in vitro*, en función de la concentración del medio basal en medios nutritivos con reguladores de crecimiento. Por el contrario, en *Aldrovanda vesiculosa* L. (Droseraceae), los explantes respondieron positivamente tanto en regeneración de vástagos como en el peso fresco de los mismos, cuando fueron cultivados en medios diluidos incluso hasta un décimo de la concentración original del medio basal MS (Parzymies *et al.*, 2022). Respecto de la longitud de vástagos, el peso fresco y seco de plantas regeneradas *in vitro* de *A. cordifolia*, en el presente estudio se ha evidenciado un comportamiento similar tendiente a la disminución gradual de las mismas en relación a la reducción de la concentración del medio basal empleado, independientemente de las accesiones evaluadas.

Según Reed *et al.* (2016) y Kovalchuk *et al.* (2018), la dilución del medio basal modifica el contenido total de diferentes macronutrientes como N, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, la relación NH₄⁺/NO₃⁻ y NH₄⁺/Ca²⁺. Esta alteración de la composición original del medio nutritivo provoca variaciones en las respuestas de crecimiento y desarrollo de vástagos regenerados *in vitro* (Teixeira da Silva *et al.*, 2020). Estos hallazgos

podrían tener relación con las respuestas observadas en *A. cordifolia* respecto de la formación de nudos por explante, la modificación de la longitud de vástagos, pesos fresco y seco de plantas regeneradas *in vitro* en función de las diluciones evaluadas, aunque mayores investigaciones son necesarias para sustentar tales afirmaciones.

Aclimatación

La regeneración *in vitro* de plantas de *A. cordifolia* fue muy alta (>80%), independientemente de la dilución del medio basal y las accesiones evaluadas, produciéndose la formación de vástagos y el enraizamiento *in vitro* de los segmentos uninodales sin necesidad de la adición de reguladores de crecimiento. Esto permitió que se cuente con plantas para la evaluación experimental de la aclimatación. En otras especies de Basellaceae, se requirió el uso de auxinas para el enraizamiento de los vástagos regenerados y pasaje a la fase de aclimatación con éxito, en condiciones *in vitro* para *B. rubra* (Kumar & Giridhar, 2021) o *ex vitro* para *B. alba* (Shekhawat & Manokari, 2016). En *U. tuberosus*, para obtener una respuesta satisfactoria de enraizamiento de vástagos y tuberización, se ha necesitado incluso de la combinación de una auxina, una citocinina y ácido giberélico para la regeneración de plantas pasibles de ser aclimatadas (Jordan *et al.*, 2002).

Hasta el momento, no se han informado estudios del efecto de la dilución del medio basal y el genotipo en la supervivencia *ex vitro* en Basellaceae, por lo que esta investigación brinda información valiosa para considerar al momento de decidir a qué condiciones de regeneración *in vitro* de plantas se deben someter los explantes de *A. cordifolia*, previo a su aclimatación. A partir de las respuestas que se obtuvieron *in vitro* en la mayoría de las variables estudiadas con segmentos uninodales de *A. cordifolia* cultivados en medio basal MS completo sin reguladores de crecimiento, se podría argüir que hubiera sido este medio de cultivo el que permitiera las mejores respuestas en la aclimatación. Sin embargo, en todas las accesiones evaluadas fue la dilución al cuarto la condición más adecuada para regenerar plantas mejor adaptadas para resistir las condiciones *ex vitro* al ser transferidas a maceta. El ambiente *in vitro* presenta alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, producción de etileno y escasez de CO₂ durante casi todo el período, lo

que conduce a una muy baja tasa fotosintética y perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esas condiciones (Rosales *et al.*, 2018). Entonces resulta fundamental obtener plantas con características morfofisiológicas apropiadas para sobrevivir a las condiciones del ambiente natural. Si bien no se han realizado estudios de esta índole en estas plantas de *A. cordifolia*, es de destacar que se observó que las plantas de mayor vigorosidad, derivadas del medio MS en su concentración original y MS 1/2 caracterizadas por una mayor longitud de vástagos y peso fresco y seco de plantas, se deshidrataron repentinamente y finalmente murieron en su mayoría durante la aclimatación. Las plantas derivadas del MS 1/8, en la mayoría de las accesiones, no prosperaron exitosamente por ser plantas pequeñas con escaso volumen radical a diferencia de las provenientes del MS 1/4 que superaron con éxito la fase de aclimatación, independientemente de la accesión (en promedio $\geq 70\%$ de plantas aclimatadas). Para optimizar las respuestas observadas durante la aclimatación de plantas de *A. cordifolia*, se pueden considerar las recomendaciones procedimentales que realizaron Shekhawat & Manokari (2016) para *B. alba* acerca de la pulverización diaria con agua por 2 o 3 semanas y Kumar & Giridhar (2021) para *B. rubra* respecto de la realización de orificios en las bolsas empleadas como cámara húmeda para sustituir su apertura y cierre diarios y la complementación de la nutrición con el fertirriego con medio basal diluido al cuarto (MS 1/4) sin sacarosa.

CONCLUSIONES

Esta contribución constituye el primer reporte acerca de la micropropagación de *A. cordifolia*. En este estudio se ha desarrollado un procedimiento eficiente para la regeneración de plantas *in vitro* de esta especie mediante el cultivo de segmentos uninodales. El protocolo completo consiste en: 1) desinfección superficial del material vegetal mediante sumersión en una solución al 70% de etanol por 1 min, posterior transferencia a una solución de hipoclorito de sodio con 1,7% de Cl activo más Triton-X-100 por 30 min y 3 enjuagues con agua bidestilada estéril; 2) multiplicación *in vitro* mediante el cultivo de segmentos uninodales en el medio basal MS diluido a un cuarto de su

concentración; 3) aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*, transfiriéndolas a macetas conteniendo sustrato comercial y cubriendo cada maceta con una bolsa de polietileno, a modo de cámara húmeda, durante 3 semanas. Estos aportes, además de permitir la micropropagación eficiente de esta especie, brindan información para el desarrollo de sistemas de conservación de germoplasma a largo plazo, dado que contar con un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* que asegure efectividad y reproducibilidad es un requisito fundamental a la hora de realizar estudios de crioconservación.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Todos los autores han realizado conjuntamente y en partes iguales el diseño experimental, la interpretación de los resultados y la redacción del manuscrito. SCS y RDM coleccionaron el material vegetal. SCS realizó los experimentos, recolectó y procesó los datos. SCS, NRD y RDM analizaron estadísticamente los datos. RDM, NRD y LAM revisaron la versión final del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (PI 18A007/18, 23A004/23 y PI 20A009/20) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP N°11220150100398 CO) por el apoyo económico y financiero de este trabajo.

DATOS PRIMARIOS

Los datos primarios de la investigación se subirán al repositorio digital del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- ABUBACKER, M. N., G. GANAPATHY, L. M. SEBASTIN & K. S MONDAL. 2019. Histochemical and shoot induction studies of *Basella rubra* L. (Basellaceae). *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* 16: 187-194. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2736>
- ALBA, T. M., C. M. GARLET DE PELEGRIN & A. M. SOBOTTKA. 2020. Pharmacognosy Ethnobotany, ecology, pharmacology, and chemistry of *Anredera cordifolia* (Basellaceae): a review. *Rodriguésia* 70: 1-11. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202071060>
- ARIZAGA, M. V., S. I. YAMAMOTO, D. TANAKA, K. FUKUI, ... & T. NIINO. 2017. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of ulluco (*Ullucus tuberosus* Cal.) using D cryo-plate method. *CryoLetters* 38: 419-427.
- AYELE, Y. Z. & W. TEFERA. 2018. Low cost sterilization technique and *in vitro* initiation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.). *J. Agric. Food Res.* 9: 1-6.
- BENOMARI, F. Z., M. SARAZIN, D. CHAIB, A. PICHETTE, ... & N. DJABOU. 2023. Chemical variability and chemotype concept of essential oils from Algerian wild plants. *Molecules* 28: 4439. <https://doi.org/10.3390/molecules28114439>
- CUBA-DÍAZ, M., C. RIVERA-MORA, E. NAVARRETE E & M. KLAGGES. 2020. Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols. *Sci. Rep.* 10: 3845. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60533-1>
- DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZÁLEZ L., ... & ROBLEDO, C. W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- DIAB, E. E. & S. E. MOHAMED. 2008. *In vitro* morphogenesis and plant regeneration of bamboos (*Oxytenanthera*). *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 3: 72-79.
- DJAMIL, R., P. R. WAHYUDI, S. WAHONO & M. HANAFI. 2012. Antioxidant activity of flavonoid from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis leaves. *Int. Res. J. Pharm.* 3: 241-243.
- GAMMOUDI, N., K. NAGAZ & A. FERCHICHI. 2022. Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi– objective genetic algorithm. *BMC Plant Biol.* 22: 1-13.
- GARMANA, A. N., E. Y. SUKANDAR & I. FIDRIANNY. 2016. Preliminary study of blood pressure lowering effect of *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis on Wistar rats. *Int. J. Pharmacogn. Pharm. Res.* 8: 300-304.
- GOICOCHEA, R. C. C., M. C. MARTÍNEZ LAURENTE & J. T. R. CHUMBES. 2020. Propiedades funcionales de productos tradicionales congelados y secados

- al sol de oca (*Oxalis tuberosa* Molina) y ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas): Una revisión. *Puriq* 2: 363-387. <https://doi.org/10.37073/puriq.2.3.100>
- HAMMOND HAMMOND, S. D., I. VIEHMANNOVA, J. ZAMECNIK & P. H. CEPKOVA. 2019. Efficient slow-growth conservation and assessment of clonal fidelity of *Ullucus tuberosus* Caldas microshoots. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 138: 559-570. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01653-z>
- HASANAHA, Y. & L. MAWARNI. 2020. Exploration and identification of *Anredera cordifolia* morphological characters in the highlands and lowlands. *Biodiversitas* 21: 2759-2766. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210652>
- HEYDARI, H. R. & E. CHAMANI. 2022. High-frequency plant regeneration and genetic fidelity assessment of regenerants by molecular and biochemical markers in Woodland Sage (*Salvia nemorosa* L.). *Ind. Crop. Prod.* 187: 115404. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115404>
- IANNICELLI, J., M. C. P. DE LA TORRE, M. A. COVIELLA, E. D. V. AGUIRRE, ... & A. S. ESCANDÓN. 2016. *In vitro* propagation of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. and detection of genetic instability through ISSR markers of *in vitro*-cultured plants. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 115: 67-76.
- JORDAN, M., A. AMENÁBAR & C. ROVERARO. 2002. Rapid *in vitro* propagation and microtuber production in *Ullucus tuberosus* (Basellaceae). *Gartenbauwissenschaft* 67: 50-54.
- JUNAIRIAH, F., N. TRI & N. I. ZURAI DASSANA AZ. 2023. Callus induction of *Anredera cordifolia* L. with various concentration of benzyl amino purin (BAP). *Eur. Chem. Bull.* 12: 2396-2400. <https://doi.org/10.31838/ecb/2023.12.1.319>
- KINUPP, V. F., F. S. AMARO & I. B. I. BARROS. 2004. *Anredera cordifolia* (Basellaceae), uma hortaliça potencial em desuso no Brasil. *Hortic. Bras.* 22: 1-6.
- KOVALCHUK, I. Y., Z. MUKHITDINOVA, T. TURDIYEV, G. MADIYEVA, ... & B. M. REED. 2018. Nitrogen ions and nitrogen ion proportions impact the growth of apricot (*Prunus armeniaca*) shoot cultures. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 133: 263-273. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1379-8>
- KUMAR, S. S. & P. GIRIDHAR. 2021. *In vitro* micropropagation of *Basella rubra* L. through proliferation of axillary shoots. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 144: 477-483. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01960-w>
- KUSUMANTI, E. & S. SUGIHARTO. 2017. Effect of dietary supplementation of binahong leaf meal, betel nut meal or their combination on serum albumin and globulin, fecal endoparasites and bacterial counts in milk of Saanen goats suffering from subclinical mastitis. *Agric. Nat. Resour.* 51: 415-419.
- LAZO-JAVALERA, M. F., R. TRONCOSO-ROJAS, M. E. TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. A. MARTÍNEZ TELLEZ, ... & M. RIVERA-DOMÍNGUEZ. 2016. Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *Springerplus* 5: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2081-0>
- LELIQIA, N. P. E., E. Y. SUKANDAR & I. FIDRIANNY. 2017. Overview of efficacy, safety and phytochemical study of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. *Pharmacologyonline* 1: 124-131.
- MANZELLI, M., L. ANDRENELLI, S. BENEDETTELLI & V. VECCHIO. 2004. Effect of temperature and sucrose on ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) microtuber production under neutral photoperiodic conditions. *Adv. Hortic. Sci.* 18:1-4.
- MARTINS, J. P. R., M. PASQUAL, A. D. MARTINS & S. F. RIBEIRA. 2015. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Aust. J. Crop Sci.* 9: 85-91.
- MEDINA, R. D., S. C. SCHALLER, N. R. DOLCE & L. A. MROGINSKI. 2017. Determinación de la eficiencia de la micropropagación de genotipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) de interés para el Nordeste Argentino. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52: 497-505. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v52.n3.18029>
- MROGINSKI, L. A., P. A. SANSBERRO, H. Y. REY & M. M. COLLAVINO. 1997. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Estado Actual y perspectivas. En: *Anais I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate*, pp. 141-151. Embrapa, Curitiba.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NASUTION, N. A., I. M. ARTIKA & D. SAFARI. 2020. Antibacterial activity of leaf extracts of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis and *Muntingia calabura* L. against *Streptococcus pneumoniae*. *Curr. Biol.* 7: 1-9. <https://doi.org/10.29244/cb.7.1.1>

- PARZYMIES, M., M. POGORZELEC & A. ŚWISTOWSKA. 2022. Optimization of propagation of the Polish strain of *Aldrovanda vesiculosa* in tissue culture. *Biology* 11: 1389. <https://doi.org/10.3390/biology11101389>
- PIÑEROS, A. L., L. M. P. OSPINA, J. F. H. MONTAÑO, M. L. I. PIÑEROS & J. R. OSORIO. 2019. Caracterización etnobotánica de las plantas medicinales empleadas en el tratamiento de las enfermedades cardiometabólicas, Villa de Leyva-Boyacá. *Rev. Cubana Plant Med.* 24: 1-22.
- PITOYO, A., RESTYKANIA, SURATMAN & SURANTO. 2019. Morphology and isozyme variation among madeira vine (*Anredera cordifolia*) accessions from southeastern part of Central Java, Indonesia. *Biodiversitas* 20: 3024-3032. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201035>
- REED, B. M., J. DENOMA, S. WADA & R. NIEDZ. 2016. Determining optimum *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm using response surface methodology. *Acta Hort.* 1113:79-84. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1113.11>
- ROSALES, C., J. BRENES, K. SALAS, S. ARCE-SOLANO & A. ABDELNOUR-ESQUIVEL. 2018. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal para incursionar en la producción hortícola. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 24: 69-84. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.08.028>.
- SAN GREGORIO, J. P. R., N. M. PIOTO, V. A. FORTI, J. RODRIGUES, P. V. DA SILVA, P. A. MONQUERO. 2021. Propagation and control of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (madeira vine). <https://doi.org/10.21475/ajcs.21.15.08.p3320>
- SHEKHAWAT, M. S. & M. MANOKARI. 2016. Optimization of *in vitro* and *ex vitro* regeneration and micromorphological studies in *Basella alba* L. *Physiol Mol Biol Plants.* 22: 605-612. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0388-5>
- SOUZA, L. F., I. B. I. DE BARROS, E. MANCINI, L. D. MARTINO, ... & V. D. FEO. 2014. Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Anredera cordifolia* grown in Brazil. *Nat. Prod. Commun.* 9: 1003-1006. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900730>
- SUGIYARTO, L. & P. C. KUSWANDI. 2014. Callus induction of binahong leaves (*Anredera cordifolia* L.) for the development of traditional medicinal plant. *J. Sains Dasar* 3: 56-60. <https://doi.org/10.21831/jdsd.v3i1.2787>
- SUKANDAR, E. Y., A. QOWIYYAH & L. LARASATI. 2011. Effect of methanol extract heart leaf madeira vine (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves on blood sugar in diabetes mellitus model mice. *J. Med. Plant Res.* 1: 1-10.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A., E. NEZAMI-ALANAGH, M. E. BARREAL, M. M. KHER, ... & J. DOBRÁNSZKI. 2020. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta* 252:47. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>
- VIEHMANNOVÁ, I., M. TRÁVNÍČKOVÁ, E. ŠPATENKOVÁ, M. ČERNÁ & P. TRÁVNÍČEK. 2012. Induced polyploidization and its influence on yield, morphological, and qualitative characteristics of microtubers in *Ullucus tuberosus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 109: 83-90. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0076-7>
- VIVIAN-SMITH, G., B. E. LAWSON, I. TURNBULL & P. O. DOWNEY. 2007. Review: The biology of Australian weeds 46. *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. *Plant Prot. Q.* 22: 1-10.
- WIDYARINI, K. D., E. Y. SUKANDAR, I. R. & D. A. FIDRIANNY. 2015. Xanthine oxidase inhibitory and anti-hyperuricemic activities of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, *Sonchus arvensis* L., and its combination. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7: 87-90.
- XIFREDA, C. C., S. ARGIMÓN & A. F. WULFF. 1999. Intraspecific characterization and chromosome numbers in *Anredera cordifolia* (Basellaceae). *Thaiszia* 9: 99-108.