

# ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE *Valeriana pyramidalis* Kunth

Carrera, Evelyn<sup>a\*</sup>; Peña, Cristian<sup>a</sup>; Jadán, Mónica<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas. "ESPE". Av. Gral. Rumiñahui s/n. Sangolquí, Ecuador.

<sup>b</sup>Laboratorio de Cultivos Vegetales de Tejidos Vegetales. Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas. "ESPE". Av. Gral. Rumiñahui s/n. Sangolquí, Ecuador.

Ingresado: 30/04/2015

Aceptado: 05/10/2015

## Resumen

*Valeriana pyramidalis* Kunth especie nativa declarada como planta patrimonial para el Distrito Metropolitano de Quito, es popularmente utilizada por su actividad calmante en el tratamiento de problemas nerviosos y cardíacos, además de enfermedades y trastornos como migraña e insomnio. Al igual que otras valerianas ha sido descrita taxonómicamente. Sin embargo, no existe ninguna publicación científica sobre sus metabolitos secundarios. En la presente investigación se planteó el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth, como un estudio base para una futura cuantificación de sus metabolitos secundarios. Inicialmente se estandarizó un protocolo de desinfección, para lo cual, foliolos fueron desinfectados empleando hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v). Para la inducción a callogénesis se empleó medio de Murashige & Skoog, suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (2.5; 2.0 y 1.5 mg/L). Se establecieron suspensiones celulares transfiriendo 1 g de callo en 20 ml de medio líquido en agitación constante (110 r.p.m.). Se obtuvo con éxito las curvas de cinética celular para cada una de las suspensiones, tras comparar estas curvas se determinó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

**Palabras clave:** Callogénesis, 2,4-D, suspensiones celulares, *Valeriana pyramidalis*.

## ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSIONS FROM LEAF SEGMENTS OF *Valeriana pyramidalis* Kunth

### Abstract

*Valeriana pyramidalis* Kunth native species declared as patrimonial plant for the Metropolitan District of Quito is popularly used for its sedative activity in the treatment of nerve, heart, migraine and insomnia problems. Like other valerian it has been described taxonomically, however, there is no scientific publication about its secondary metabolites. In this research it was proposed the establishment of cells suspensions cultures of *Valerian pyramidalis* Kunth, as a basis of future study for quantification of their secondary metabolites. Leaflets were disinfected using sodium hypochlorite 0, 5 % (v / v). Callus formation was significant in Murashige & Skoog media supplemented with different concentration of 2, 4-D (2.5; 2.0 and 1.5 mg / L). The cell suspension culture was established by transferring 1 g of calli to 20 ml liquid media an agitating condition (110 rpm). The growth kinetic curve was successfully obtained for each one of the suspension, after comparing these curves, it was determined no significant difference exists between the treatments.

**Keywords:** Calli, cells suspensions cultures, 2, 4-D, *Valeriana pyramidalis*.

## I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador se han registrado 35 especies de valeriana, 8 endémicas y 27 nativas, [1] entre las cuales, se encuentra *Valeriana pyramidalis*, declarada como

\*Correspondencia a: Evelyn Carrera, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Av. Gral. Rumiñahui s/n. Sangolquí, Ecuador. Correo electrónico: evelyn88\_16@hotmail.com

planta patrimonial para el Distrito Metropolitano de Quito, ya que forma parte de su historia botánica.[2] Por su actividad calmante, antiespasmódica, carminativa, estimulante e hipnótica se utiliza para tratar todo tipo de problemas nerviosos, migraña e insomnio.[3] Dentro de la medicina empírica y ancestral ecuatoriana se ha considerado como una planta mágica al ser empleada por curanderos en el tratamiento de dolencias de origen folclórico, o sobrenatural como son el espanto y mal de viento.[4]

*Valeriana pyramidalis* ha sido descrita taxonómicamente, sin embargo, no se ha publicado ningún artículo científico sobre sus metabolitos secundarios o sobre la producción *in vitro* de los mismos.[3] Estudios realizados en otras especies del género valeriana revelan que los compuestos bioactivos se localizan en mayor cantidad en las raíces y rizomas de la planta.[5]

En cuanto a la producción *in vitro* de metabolitos secundarios. Salleset *al.*, (2002) estandarizaron un protocolo para la propagación *in vitro* de *Valeriana glechomifolia*, obteniendo con éxito plántulas de las cuales se empleó sus raíces y rizomas para cuantificar la cantidad de valtratos que son monoterpenos irridoides diénicos y representan los principios activos de la familia *Valerianaceae*. [6] En investigaciones subsiguientes se evaluó la producción de valtratos en células no transformadas (callos), suspensiones celulares y raíces, comprobándose la aplicabilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la cuantificación y producción de metabolitos secundarios.[7] El objetivo de la presente investigación fue establecer suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* como un estudio base para la futura cuantificación de sus metabolitos secundarios.

## II. METODOLOGÍA

### Recolección del material vegetal

Se identificó las plantas en chacras, pastizales y bordes de camino cercanos a la hacienda "Santa Inés" (latitud E 17790940; longitud N 0963006; altitud 2725 msnm) que está ubicada en la parroquia Pintag-Ecuador. Se seleccionaron diez plantas vigorosas y visiblemente sanas. Se extrajo la planta completa colocándose en macetas que contenían tierra propia del lugar, las plantas recolectadas fueron trasladadas hacia los invernaderos ubicados en los pasillos exteriores del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Sangolquí-Ecuador.

### Identificación de la especie

Para la identificación del material vegetal se empleó el

método de comparación, donde se compararon las plantas recolectadas en campo con las especies de valeriana existentes en el Herbario QBA de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), para la confirmación de la identidad taxonómica de las mismas, se contó con el apoyo de Carol Auer, experta en botánica e investigadora del Departamento de Ciencias Vegetales de la Universidad de Connecticut (EEUU) y Tatiana Jaramillo, directora técnica del Jardín Botánico de Quito.

### Aclimatación y tratamiento fitosanitario

La fase de aclimatación se llevó a cabo en los invernaderos antes mencionados. Se realizó la aclimatación el mismo día del muestreo, cuidadosamente se retiró la tierra de las raíces para luego sumergirlas en una solución de enraizador universal (principios activos: AIB, AIA, Citoquinina y Arginina) a 1 mL/L de concentración por 15 minutos, finalmente se sembró cada planta agregando a las macetas una mezcla preparada de turba, tierra negra y cascajo en proporciones de 2:1:1.[8] Se aplicó un tratamiento fitosanitario a las plantas que consistió en la aspersión foliar de soluciones fungicidas Carbelac (principio activo: Carbendazim 500 g/L) a una concentración 3 mL/L y Captan 80 PM (principio activo: Captan 800g/kg) a una concentración de 3 g/L, se aplicó dicho tratamiento 2 veces por semana durante 30 días.[9]

### Selección del material vegetal

*Valeriana pyramidalis* se caracteriza por tener hojas compuestas cuyo número de foliolos es impar con un foliolo terminal al final del raquis.[3] En este estudio se utilizó foliolos terminales y primarios por presentar mayor área foliar con relación a los terciarios, seleccionándose hojas jóvenes debido a que las células vegetales presentan mayor actividad regenerativa y los tejidos menor diferenciación celular lo que permite un mejor desarrollo *in vitro*. [10]

### Desinfección y establecimiento de foliolos

Las hojas seleccionadas fueron lavadas en agua corriente por 5 minutos, a continuación se cortó foliolos terminales y primarios que fueron sumergidos en una solución de detergente comercial a una concentración del 1% p/v más Tween-20® al 2% por 10 minutos en agitación continua, luego se realizó 3 lavados del material vegetal con agua destilada estéril. En cámara de flujo laminar, los foliolos fueron sometidos a una solución de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (0,5; 0,8 y 1% v/v), con tiempos de inmersión de 5 y 10 minutos. [9] A continuación se efectuaron 3 lavados con agua

destilada estéril para luego secar completamente el foliolo empleando servilletas autoclavadas. Finalmente se cortó segmentos foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> que fueron colocados en medio Murashige & Skoog, (1962) con sales completas, vitaminas, sin reguladores decrecimiento, suplementado con 30 g/L de sacarosa y 6,5 g/L de Bacto agar, el pH se ajustó entre 5.7 - 5.8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de 23 ± 1°C, 60% de humedad relativa, intensidad lumínica de 2000 - 2500 luxes, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad. Se realizó 10 repeticiones por cada tratamiento. La unidad experimental fue un segmento foliar por frasco. Los datos fueron evaluados a los 30 días de incubación para la variable contaminación y necrosis.

### Inducción a callo

Una vez determinado el mejor tratamiento de desinfección para foliolos de acuerdo a las variables antes mencionadas, se continuó con la etapa de inducción a callo para lo cual se realizó una nueva introducción de foliolos. Segmentos foliares asépticos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> fueron colocados en medio Murashige & Skoog, (1962) con sales y vitaminas, suplementado con 6 diferentes concentraciones de 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg/L), 30 g/L de sacarosa y 6,5 g/L de Bacto agar, el pH se ajustó entre 5.7- 5,8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N. Se efectuaron 10 repeticiones por cada tratamiento. Los datos fueron registrados a los 30 días de incubación para las variables formación de callo y peso fresco del callo formado. La unidad experimental fue un segmento foliar por frasco. Se determinó el peso fresco de callo mediante el empleo de una balanza analítica. Una vez determinado los 3 mejores medios de respuesta para la formación de callo, se continuó con la siguiente etapa del experimento.

### Suspensiones celulares: Iniciación de las suspensiones celulares

Para el establecimiento de suspensiones celulares se siguió la metodología propuesta por Freire en el 2013, para lo cual se transfirió de 1 g de callo friable a 20 mL de medio líquido en matraces Erlenmeyer de 100 mL de capacidad. El medio empleado fue Murashige & Skoog, (1962), con sales completas y vitaminas, suplementado 30 g/L de sacarosa, 6,5 g/L de Bacto agar y 2,4-D en varias concentraciones de acuerdo a los medios seleccionados en la etapa anterior, el pH se ajustó entre 5,7- 5,8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N. Las suspensiones celulares se incubaron 23 ± 2°C sobre un agitador orbital rotatorio (Wisd SHO-2D) a una velocidad de 110 r.p.m. en condiciones de oscuridad. Se realizó recambio de medio cada 15 días durante tres meses reemplazándose el 50% del medio antiguo por medio

fresco, transcurrido ese tiempo se tamizó las suspensiones empleando una malla de acero inoxidable N° 50, obteniéndose una suspensión celular homogénea. La unidad experimental durante esta etapa fue un Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 1 g de callo friable y 20 mL de medio, se hicieron 10 repeticiones por tratamiento.

### Suspensiones celulares: Recuento Celular

El crecimiento celular se evaluó mediante conteos celulares usando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y un microscopio óptico (Olympus modelo BX- 48). Los conteos celulares se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por la casa comercial Celeromix considerándose 5 cuadros grandes de la cámara de Neubauer. El número de células por volumen se calculó mediante la siguiente fórmula (Ec. 1): [12]

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} * 10000}{\text{número de cuadros}} \quad (\text{Ec. 1})$$

El conteo celular se efectuó cuatro veces por suspensión, cada 2 días por un periodo de 30 días, con estos datos se determinó la curva de crecimiento, donde el eje (x) es el tiempo en días y el eje (y) es el número de células por mililitro. Este procedimiento de conteo se aplicó a los tres tratamientos seleccionados en la etapa anterior. [12]

### Análisis de datos

En la etapa de desinfección y establecimiento de foliolos, se evaluó la combinación de tres niveles de porcentaje de hipoclorito de sodio (NaClO); 0.5%, 0.8 y 1% frente a dos tiempos de inmersión 5 y 10 minutos, generándose un diseño factorial de 3 x 2, evaluándose las variables contaminación y necrosis a los 30 días de incubación de los explantes en las condiciones descritas en materiales y métodos. En la etapa de formación de callo se determinó el efecto de la hormona 2,4-D en la formación de callo, para esto se probó con 5 concentraciones de hormona (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 y 2.5 mg/L 2,4-D) más un control (0 mg/L 2,4-D), realizándose en total 6 tratamientos, evaluándose la variable formación de callo a los 30 y 60 días de incubación en las condiciones ya descritas. Finalmente en la etapa de establecimiento de suspensiones celulares se probaron tres tratamientos efectuándose conteos celulares y la cinética celular para cada tratamiento.

Para el análisis de los datos obtenidos en cada etapa se empleó el paquete estadístico InfoStat® (2011), aplicándose un análisis inferencial que consistió en análisis de varianza ANOVA, análisis de varianza de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, regresión logística y comparaciones múltiples de Duncan para

cada variable, en todas las pruebas se empleó un nivel de significancia del 5%.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras realizar un análisis exploratorio e inferencial de los datos se determinó que el mejor tratamiento de desinfección considerando las variables contaminación y necrosis, fue el tratamiento 2 que corresponde a una concentración de hipoclorito de sodio de 0.5% v/v-tiempo de inmersión de 10 minutos, el cual, generó porcentajes de contaminación del 20% y necrosis del 40%.

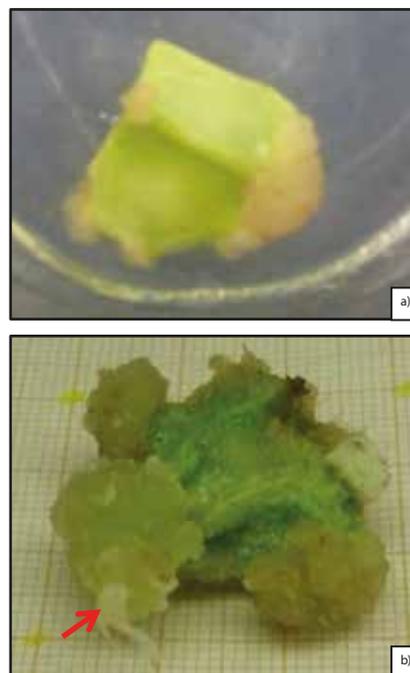
En la desinfección de foliolos de *Valeriana pyramidalis* se empleó el agente desinfectante hipoclorito de sodio, los resultados obtenidos, confirman lo aseverado por Bhojwani & Razdan en 1996, quienes mencionan que el hipoclorito de sodio es uno de los agentes desinfectantes más efectivos en la eliminación de microorganismos. Según CESVBC, (2014) cuando el hipoclorito de sodio se adiciona al agua, se genera ácido hipocloroso neutral que penetra con facilidad la pared celular de los microorganismos matando de manera efectiva a los patógenos.

En cuanto a la necrosis Dolberg en el 2006, asevera que la alta mortalidad de los explantes se evidencia cuando se emplea concentraciones elevadas de hipoclorito de sodio. A pesar que la concentración de hipoclorito de sodio (0.5%) es baja, con relación a las demás concentraciones, el tiempo de inmersión de 10 minutos, garantiza la obtención de explantes asépticos, evitando la necrosis del explante. Es importante recalcar que el tiempo de inmersión influye en el nivel de contaminación, más no la concentración de hipoclorito de sodio.

Roca & Mroginski, (1993) recomiendan la agregación de agentes tensoactivos como Tween 20® a la solución desinfectante, debido a que potencian la acción del agente desinfectante reducen la tensión superficial, mejorando el contacto superficial entre explante y solución, además al aumentar el tiempo de inmersión la acción del agente desinfectante mejora, esto podría explicar la alta efectividad mostrada en los ensayos.

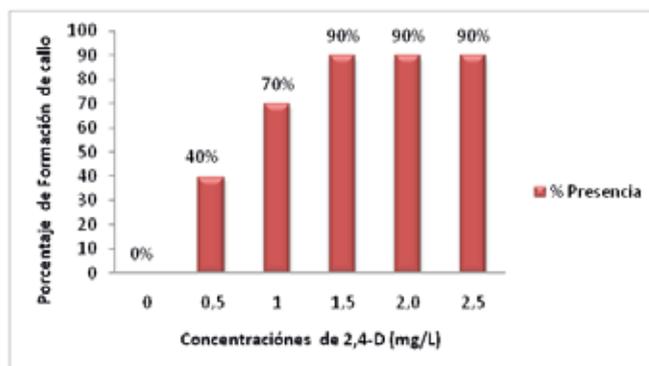
A los 30 y 60 días de incubación se observa la presencia de callos traslúcidos (Figura 1), de textura friable y coloración blanquecina-verdosa, la mayor formación de callo se da a los 60 días, esto se debe principalmente a que a partir de ese tiempo gran parte de 2,4-D añadido al medio es metabolizado por el explante. [17]

En concordancia, con Lorente, (2012) la generación de callo se dio únicamente en el envés de la hoja de manera específica en la nervadura central y los bordes del explante, es decir la zona de contacto con el explante.



**Figura 1.** Formación de callo. a) Callo formado a los 30 días de incubación y b) callo formado a los 60 días de incubación la flecha roja muestra las raíces formada a partir del callo.

Estudios realizados por Zebarjadi, *et al.*, (2011), en *Valeriana officinalis*, Maurmannet *al.*, (2006) en *Valeriana glechomifolia* y Mathur & Ahuja, (1991) para *Valeriana wallichii*, señalan que la adición de la auxina 2,4-D al medio, permite la exitosa formación de callo en el explante. En la presente investigación se observó la formación de callo en todos los tratamientos que incluían la auxina 2,4-D, mientras que en el tratamiento control, no hubo formación de callo, estos resultados confirman el efecto directo de la hormona 2,4-D, en la des diferenciación de tejidos y formación de callo.



**Figura 2.** Porcentaje de formación de callo por explante con respecto a la concentración de 2,4-D, tratamientos evaluados a los 30 días de incubación.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, las concentraciones de 2.5 mg/L, 2.0 mg/L y 1.5 mg/L 2,4-D son efectivas en la inducción a calogénesis, ya que presentan un porcentaje de formación de callo de 90%, evidenciándose que al incrementar la concentración de la auxina 2,4-D, se genera mayor porcentaje de calogénesis en los explantes (Figura 2).

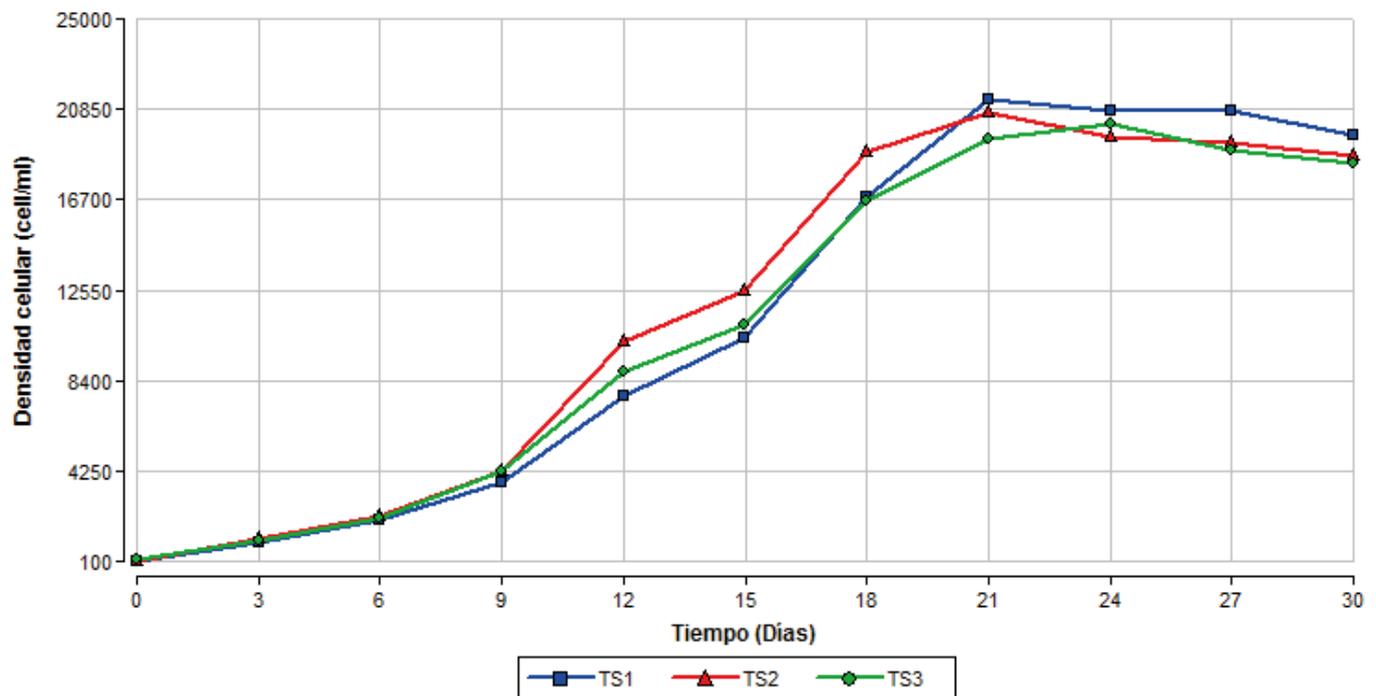
Adicionalmente en estos tratamientos se observó la formación de raíces que se originaron del callo (Figura 1b), esto podría explicarse por las altas concentraciones de 2,4-D empleadas, ya que según Roca & Mroginski, (1993), una alta concentración de auxinas potenciará la formación de raíces en los explantes, a su vez, en las investigaciones realizadas por Zebarjadi, *et al.*, (2011), Maurmann *et al.*, (2006) y Mathur & Ahuja, (1991) también se observó la formación de raíces a partir del callo formado, los resultados sugieren que este evento es característico de la familia Valerianaceae.

### Suspensiones celulares: Cinética celular

Esquivel & Escalant, (1994) recomiendan que a escala de laboratorio, se inicie el establecimiento de la suspensión con cantidades pequeñas de callo, por ende para establecimiento de las suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis*, se transfirió 1 g de callo friable a 20 ml de medio líquido. Freire, (2013) y Pérez, (2010) mencionan que se puede emplear de 1 g a 20 g de callo, sin embargo, el tiempo de establecimiento de la

suspensión será mayor. Antes de comenzar con los conteos celulares, las suspensiones fueron tamizadas, obteniéndose una suspensión homogénea, Mustafá *et al.*, (2011) enuncian que una suspensión celular homogénea se prefiere como modelo de estudio, ya que provee una alta reproducibilidad en los experimentos. Durante el desarrollo celular de *Valeriana pyramidalis* se identificó 5 fases de crecimiento. La fase de retraso (fase 1) se evidenció a los 6 días de cultivo. Roca & Mroginski, (1993) menciona que durante el transcurso de esta fase las células se adaptan a su nuevo entorno y por tanto no se da la división celular. La fase exponencial (fase 2) se extiende del día 6 hasta el día 20, esta etapa se caracteriza por un crecimiento celular acelerado y aumento del volumen celular. A partir del día 24 se denota la fase de desaceleración (fase 3) que según Villalobos & García, (2012) está asociada al agotamiento de los nutrientes en la suspensión así como al agrupamiento de las células. Entre el día 21 y 24 se denota la fase crecimiento lineal. A partir del día 25 el crecimiento celular empieza a disminuir, esta fase se describe como desaceleración progresiva (fase 4), y a partir del día 27 la densidad celular se mantiene siendo esta la fase estacionaria (fase 5).

El análisis estadístico de la cinética celular de los tratamientos empleados en el establecimiento de suspensiones TS1 (2.5 mg/L), TS2 (2.0 mg/L) y TS3 (1.5 mg/L), reveló que no existen diferencias



**Figura 3.** Comparación de curvas de cinética celular para los tratamientos TS1, TS2 y TS3 empleados en el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis*.

significativas entre estos tres tratamientos (Figura 3). Las células que conforman una suspensión homogénea presentan un comportamiento similar entre sí, esto podría explicar la similitud entre los tratamientos.[23] En cuanto a la obtención de metabolitos secundarios es preferible emplear una suspensión celular en donde se mantengan los agregados celulares, debido a que en una suspensión celular “fina” las células son similares y por tanto resulta difícil que en cada una de ellas se lleven a cabo todos procesos necesarios para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los resultados de Horst *et al.*, (1989), Schlatmann *et al.*, (1995), Montiel *et al.*, (2007) muestran que la obtención de agregados celulares es una estrategia que favorece la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro*, por lo que se esperaría una concentración menor de metabolitos en nuestras suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* ya que estas son suspensiones “finas” de células, es decir sin agregados celulares.

#### IV. CONCLUSIONES

Se determinó que la hormona 2,4-D, influye significativamente en la formación de callo a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis*, ya que en el tratamiento control (0 mg/L 2,4-D) no hubo formación de callo en los explantes.

Se logró establecer suspensiones celulares homogéneas a partir de callo friable evaluándose tres tratamientos TS1 (2.5 mg/L 2,4-D), TS2 (2.0 mg/L 2,4-D) y TS3 (1.5 mg/L 2,4 D). Para la variable densidad celular no se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Se obtuvo con éxito la curva de cinética celular de *Valeriana Pyramidalis* para los tres tratamientos probados, identificándose cinco fases: 1) retraso o latencia, 2) exponencial, 3) disminución progresiva, 4) lineal y 5) estacionaria.

#### Agradecimientos

La presente autora agradece el apoyo proporcionado por el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, en especial a M.Sc. Mónica Jadán por abrirme las puertas del laboratorio, gracias a su sabiduría, conocimiento y paciencia he logrado culminar esta investigación con éxito. A la vez me gustaría agradecer a la Ing. Rosita Grijalva por contribuir en la revisión de este artículo científico.

#### Referencias

[1] C. Bell (2003) “Systematics of Valerianaceae”. Obtenido de

<http://phylodiversity.net/cbell/Valerianaceae.html>

[2] C. Rúaless & E. Guevara (2010) “La flora patrimonial de Quito descubierta por la expedición de Humboldt y Bonpland en el año 1802”. *Avances*. 2(3), B54-B63.

[3] T. Jaramillo (2013) “Plantas Nativas de la Hoya de Quito”. (J. B. Quito, Ed.) Quito, Ecuador: Fundación Botánica de los Andes.

[4] A. Cavender, & M. Albán (2009) “The use of magical plants by curanderos in the Ecuador highlands”. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3. Web. 5.

[5] L. Salles, A. Silva, A. Fett-Neto, G. von Poser, & S. Rech (2002) “*Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates”. *Plant Sci*. 163, 165–168.

[6] J. Garrido (2007) “Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de ácido valérico o sus derivados en extracto de hojas y raíz de valeriana (*Valeriana Prionophylla* Stand)” Tesis de grado; F. de Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

[7] N. Maurmann, D. Russowski, S.Rech, &A. Fett-Neto (2006) “Role of light and medium composition on growth and Valepotriates contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 211-218.

[8] F. Zurita (2014) “Conteo cromosómico de la especie *Polylepis incana* en tres poblaciones del Ecuador (El Inga, Papallacta, El Ángel) a partir de meristemos radicales”. Tesis Ing. en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas.ESPE Sangolquí, Ecuador.

[9] M. Criollo (2013). Propagación *in vitro* de genotipos seleccionados de tomate de árbol (*Solanum Betaceum* Cav.) a partir de meristemos, utilizando un sistema de inmersión temporal. Tesis Ing. en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí, Ecuador.

[10] M, Arteaga (2012). “Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro* de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos peciolares y *in vitro*-explantes hipocotiledonares y radiculares de Moringa oleifera”. Tesis de grado. Departamento de ciencia y producción agropecuaria Ing. Agronómica. Universidad Zamorano. Honduras.

[11] T. Murashige &F.Skoog, (1962) “A revised médium for rapid growht and bioassays with tobacco tissue cultures”.*Physologia Plantarum*. 15:473-497

[12] P. Freire (2013) “Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ)”. Tesis Ing. en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE. Sangolquí, Ecuador.

[13] S. Bhojwani& M. Razdan (1996) “Plant tissue culture: Theory and Practice”, a Revised Edition. Amsterdam. Elsevier. 467.

[14] CESVBC (2014) “Manual técnico de desinfección

- poscosecha". Obtenido de: <http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectantes-hipoclorito-de-sodio.htm>.
- [15] F. Dolberg (2006) PROQUIMSA S.A. Obtenido de Hoja de Seguridad de Materiales: [http://www.proquimsaec.com/images/hoja\\_seguridad/H\\_S\\_33\\_HIPOCLORITO\\_DE\\_SODIO.pdf](http://www.proquimsaec.com/images/hoja_seguridad/H_S_33_HIPOCLORITO_DE_SODIO.pdf).
- [16] W. Roca & L. Mroginski (1993) "Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones". (W. M. Roca, Ed.) Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 969.
- [17] F. Bronsema, P Redig, H. Van Oosteven, & A Van Onckelen (1996) "Uptake and biochemical analysis of 2, 4-D in cultured cigotic embryos of *Zea mays* L". *Plant Physiol.* (149), 3. 363-371.
- [18] A. Lorente (2012) "Evaluación del cultivo *in vitro* de variedades de vid cultivadas en la DOCA Rioja". Proyecto Fin de Carrera. Universidad de la Rioja. España.
- [19] A. Zebarjadi, S. Najafi, H. Ghasempour, & D. Motamedi (2011) "Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. vía Agrobacterium rhizogenes". *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 4985-4990.
- [20] J. Mathur, Singh, & P.Ahuja (1991) "Plant regeneration from callus cultures of *Valeriana Wallichii* DC". *Plant Cell Rep.*, 9. (9), 523-526.
- [21] A. Esquivel, & J. Escalant (1994) "Conceptos Básicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales". Turibalba, Costa Rica: OrtonIICA / CATI.
- [22] J. Pérez (2010) "Evaluación de la producción de fotoquímicos a partir de cultivo de células en la suspensión de Neriumoleander". Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Colombia.
- [23] R. Mustafa, W. Winter, F. Van Iren, & R. Verpoorte (2011) "Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures". *Nature Protocols*, 6. 715-720.
- [24] M. Villalobos & E.García (2012) "Características marcadoras en suspensiones celulares embriogénicas de banano cien BTA-03(AAAA) y su parental Williams (AAA)". *Bioagro*. 24(2), 73-82.
- [25] G. Trejo & M. Rodríguez (2007) "La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*". *Interciencia*. 32(10), 671-675.
- [26] A. Hulst, T. Meyer, H. Breteler, J. Tramper (1981) "Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetespatula* on thiophene production and cell growth". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, (1). 18-25.
- [27] J. Schlatmann, J. Vinke, H. Hoopen, J. Heijnen (1995) "Relation between dissolved oxygen concentration and amalicine production rate in high density cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotechnol. Bioeng.* 45(5), 435-439.
- [28] G. Montiel, C. Breton, M. Thiersault, V. Burlat, C. Jay-Allemand, P. Gantet (2007) "Transcription factor Agamous-like 12 from *Arabidopsis* promotes tissue-like organization and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells". *Metab.Eng.* 9. (2). 125-132.