



Inducción a células madre en hojas de *Rumex crispus* L., utilizando tres concentraciones de Citoquininas y auxinas

Guatapi Galarza, María Isabel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz PhD.

28 de Febrero del 2023

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Proyecto de Titulación SII OCT 22 - MAR 23

NOMBRE DEL ALUMNO

MARIA ISABEL GUATAPI GALARZA

NOMBRE DEL ARCHIVO

MARIA ISABEL GUATAPI GALARZA - Tesis

SE HA CREADO EL INFORME

22 feb 2023

Resumen

Fragmentos marcados	2	0,5 %
Fragmentos citados o entrecomillados	0	0 %

Coincidencias de la Web

scielo.org.co	2	0,5 %
---------------	---	-------

1 de 2 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

...crecimiento pueden producirse en algunos organismos o sintetizarse químicamente. **Cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos y a nivel celular**

Mejor coincidencia en la Web

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, son similares a las fitohormonas y **cumplen un papel importante en la regulación de...**

Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el ... http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109

2 de 2 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

De igual manera, **las citoquininas** son fitohormonas derivadas de la adenina, **tienen la capacidad de estimular e inducir la división celular, raíces y activar la senescencia de las hojas**

Mejor coincidencia en la Web

Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la...

22/2/23, 12:36

Proyecto de Titulación

[script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109)





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Inducción a células madre en hojas de *Rumex crispus L.*, utilizando tres concentraciones de Citoquininas y auxinas**” fue realizado por la señorita **Guatapi Galarza María Isabel**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente

Sangolquí, 28 de febrero de 2023



Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph. D.

C. I.: 1802278562



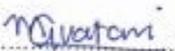
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Guatapi Galarza María Isabel** con cédula de ciudadanía n° 1756053797, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Inducción a células madre en hojas de *Rumex crispus L.*, utilizando tres concentraciones de Citoquininas y auxinas**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023


.....

Guatapi Galarza María Isabel

C.I.: 1756053797



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **María Isabel Guatapi Galarza** con cédula de ciudadanía n° 1756053797, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "Inducción a células madre en hojas de *Rumex crispus* L., utilizando tres concentraciones de Citoquininas y auxinas" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de febrero de 2023

Guatapi Galarza María Isabel

C. I.: 1756053797

Dedicatoria

A Dios/Diosa que me mostró caminos y de la mano cocreamos una realidad amorosa

A mi madre por enseñarme que las mujeres tenemos poder, intuición, ternura y suavidad

A mi padre por heredarme su coraje y determinación durante estos 24 años

A mi hermano por enseñarme matemáticas con paciencia hasta las 12 am

A mis profesores quienes además de la enseñanza me inculcaron valores

A mi compañero espiritual Lucas por inspirarme

María Isabel Guatapi Galarza

Agradecimientos

Agradezco a Dios/Diosa que ha puesto en mi camino a seres que han sido guía, apoyo y una demostración de que su amor es infinito y está en todas partes.

Agradezco a mis padres Manuel y Alexandra, quienes me han demostrado que con amor, determinación e intuición se puede lograr grandes cosas. El amor incondicional que me han brindado ha hecho que mi espíritu florezca.

Agradezco a mi hermano Andrés, quién se quedaba hasta las 12 am explicándome con paciencia materias que no comprendía, además de demostrarme que la constancia es una semilla que luego da frutos.

Agradezco con todo mi corazón a mi compañero espiritual Lucas, que hoy ya no se encuentra físicamente en este plano de existencia, por acompañarme en mis logros, tristezas y alegrías durante 12 años de mi vida.

A mis profesores del colegio Giovanni Antonio Farina, quienes me brindaron bases para mi vida estudiantil

A mis amigos y amigas que son la muestra de amistad incondicional

A la Doctora Mónica Jadán que me ha compartido sus conocimientos y ejemplo de poder en las mujeres.

María Isabel Guatapi Galarza

Índice

Carátula.....	1
Informe de originalidad	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice.....	8
Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras	10
Resumen.....	11
Abstract	12
Capítulo I: Introducción.....	13
<i>Planteamiento del problema</i>	13
<i>Justificación del problema</i>	14
Objetivos.....	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis.....	16
Capítulo II: Marco Teórico	17
Género Rumex	17
Origen y distribución.....	17
Clasificación taxonómica.....	17
Características botánicas	18
Cultivo in vitro de tejidos vegetales	19
Tipos de micropropagación in vitro.....	19
Organogénesis directa	20
Organogénesis indirecta (callogénesis).....	20
Callogénesis.....	20
Embriogénesis directa	21
Embriogénesis indirecta	21
Factores que influyen en la propagación in vitro.....	21
Medios de cultivo.....	24

<i>Reguladores de crecimiento</i>	25
Capítulo III: Metodología.....	26
Fase de campo.....	26
Ubicación geográfica del área de muestreo	26
Fase de Laboratorio	26
Desinfección de hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	26
Optimización del medio de cultivo.....	28
Inducción a células madre a partir de hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	28
Capítulo IV: Resultados	30
Desinfección de hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	30
Optimización del medio de cultivo	32
Inducción a células madre a partir de hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	33
Capítulo V: Discusión	38
Desinfección de hojas en <i>Rumex crispus</i> L.....	38
Optimización del medio de cultivo	39
Capítulo VI: Conclusiones	41
Capítulo VII: Recomendaciones	42
Capítulo VII: Bibliografía	43

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de la especie <i>Rumex crispus</i> L.....	18
Tabla 2 Diseño experimental del protocolo de desinfección para hojas de <i>Rumex crispus</i> L.	27
Tabla 3 Medio de cultivo para la inducción a células madre en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.	29
Tabla 4 Prueba de normalidad de shapiro-wilks para inducción de células madre en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.	34
Tabla 5 Análisis de varianza no paramétrica de kruskal wallis para inducción de células madre en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	34

Índice de Figuras

Figura 1 Ristribución geográfica de <i>Rumex crispus</i> L. en el Ecuador.....	17
Figura 2 Ejemplar de la planta <i>Rumex crispus</i> L.	19
Figura 3 Hongo <i>Uromyces rumicis</i> en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	22
Figura 4 Protocolo de desinfección en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.....	27
Figura 5 Gráfico correspondiente a contaminación, necrosamiento y viabilidad a los 15 días de cultivo de hojas en <i>Rumex crispus</i>	30
Figura 6 Representación gráfica de contaminación fúngica y bacteriana en los explantes de <i>Rumex crispus</i> L.	31
Figura 7 Análisis de varianza de duncan para contaminación a los 14 días de inducción en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.	32
Figura 8 Análisis de varianza de duncan para optimización del medio de cultivo a los 14 días de inducción en ms ½ y ms completo de <i>Rumex crispus</i> L.....	33
Figura 9 Diagrama de barras de las medias de cada tratamiento utilizado en la inducción de células madre en hojas de <i>Rumex crispus</i> L.	35
Figura 10 Proceso de inducción a callogénesis <i>in vitro</i> a partir de hoja de <i>Rumex crispus</i> L. en el transcurso de 49 días.	36
Figura 11 Raíces adventicias en células madre de <i>Rumex crispus</i> L.....	37

Resumen

Rumex crispus L., es una planta medicinal, comúnmente conocida como “Lengua de vaca” caracterizada por crecer como maleza en zonas templadas y frías, proveniente de Europa, Asia y África con propiedades antimicrobianas, hipoglucemiantes, antihelmínticas, antiulcerogénicas, así como, también posee características hepatoprotectoras, antipiréticas, analgésicas, entre otras. Debido a la importancia y aplicación en la industria farmacéutica ha sido necesario aplicar técnicas de cultivo de tejido vegetales *in vitro*, la cual proporciona metodologías para la inducción de células madre y la subsecuente producción de metabolitos secundarios. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es inducir a células madre en hojas de *Rumex crispus* L., utilizando tres concentraciones de citoquininas y auxinas. Como primer paso se estandarizó un protocolo de desinfección el cual consistió de una solución de detergente al 2% por 15 min, fungicida al 1% por 10 min, hipoclorito de sodio al 5% por 3 min, obteniéndose un porcentaje de explantes libres de contaminación del 81%. Seguido así, se optimizó un medio de cultivo semisólido con MS a la mitad de la concentración y MS a concentración completa, el cual dio un porcentaje de viabilidad del 62%, siendo este el mejor resultado. Finalmente se indujo a la inducción de células madre en el cual, el tratamiento con mejores resultados fue de: 3 mg/L de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) + 1,17 mg/L ácido indolacético (AIA), con un porcentaje de formación de células madre del 87%, correspondiente al tratamiento 3.

Palabras clave: Células madre, *in vitro*, ácido indolacético, 6-Bencilaminopurina.

Abstract

Rumex crispus L., is a medicinal plant, commonly known as "Cow's tongue" characterized by growing in temperate and cold areas, from Europe, Asia and Africa with antimicrobial, hypoglycemic, anthelmintic, antiulcerogenic properties, It has hepatoprotective, antipyretic, and analgesic characteristics, among others. *Rumex crispus* L., has importance and application in the pharmaceutical industry, it has been necessary to apply *in vitro* plant tissue culture techniques, which provide methodologies for the induction of stem cells and the subsequent production of secondary metabolites. For this reason, the objective of this study is to induce stem cells in *Rumex crispus* L. leaves, using three concentrations of cytokinins and auxins. As a first step, a disinfection protocol was standardized, which consisted of a 2% detergent solution for 15 min, 1% fungicide for 10 min, 5% sodium hypochlorite for 3 min, obtaining a percentage of explants free of contamination. 29%. Following this, a semisolid culture medium was optimized with MS at half the concentration and MS at full concentration, which gave a viability percentage of 62%, this being the best result. Finally, the induction of stem cells was induced, in which the treatment with the best results was: 3 mg/L of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) + 1.17 mg/L indoleacetic acid (IAA), with a percentage stem cell formation of 87%, corresponding to treatment 3.

Keywords: Stem cells, *in vitro*, indoleacetic acid, 6-Benzylaminopurine.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Rumex Crispus L., es considerada como una planta medicinal con múltiples beneficios. Ha sido estudiada para comprobar la efectividad antimicrobiana, hipoglucemiante, antihelmíntica, antiulcerogénica, hepatoprotectora, antipirética, analgésica, entre otras. Su efectividad se ha documentado en todo el mundo, sugiriéndose que tiene un buen potencial para el desarrollo de nuevos fármacos (Idris *et al.*, 2017).

Rumex Crispus L., es una planta perenne, proveniente de Europa, considerada como planta introducida en América y reconocida como maleza, crece fácilmente y es más resistente que otras plantas. Tiene una gran adaptación a los cambios climáticos. Por este motivo, su producción se facilita, pero, se desea producir a gran escala debido a sus aplicaciones farmacológicas (CABI, 2022).

En la actualidad se conoce el cultivo *in vitro* de plantas como una técnica de propagación a gran escala, ya que disminuye los factores que interfieren en el crecimiento y producción, como: tiempo de madurez, condiciones climáticas, susceptibilidad a enfermedades o plagas, eficiencia, etc (Calva & Pérez, 2005). En efecto, esta técnica proporciona múltiples beneficios, los cuales son: micropropagación, producción de metabolitos, investigación de procesos bioquímicos y morfológicos, mejoramiento genético de las plantas, propagación clonal, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2014).

Las plantas pueden inhibir su desarrollo por algunos microorganismos, dentro de ellos están: hongos, bacterias y levaduras, denominados como vitropatógenos, son perjudiciales para el cultivo de tejidos, a nivel celular, de tejidos u órganos. Al mismo tiempo, compiten con el explante por los nutrientes que tiene el medio de cultivo y llegan a colonizar el tejido o generar metabolitos tóxicos. Para obtener una mejor eficiencia en el fin deseado, es necesario tener una desinfección correcta, además de un medio de cultivo efectivo para el crecimiento, producción de metabolitos o células madres (Herández & González, 2010).

Justificación del problema

Las plantas medicinales se han utilizado desde hace años como método antimicrobiano, analgésico, farmacéutico, insecticida, plaguicida, etc. Con el tiempo se ha preferido utilizar las plantas medicinales para prevenir o tratar ciertas enfermedades (Idris *et al.*, 2019). *Rumex Crispus* L., es una planta medicinal que crece en la zona andina, y es utilizada como medicina natural para tratar afecciones en el tracto gastrointestinal, artritis, como laxante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, etc. Algunos grupos ancestrales, como: parteros, chamanes y hueseros, denominan a *Rumex Crispus* L., como “Lengua de vaca” (BUAP, 2017).

Rumex Crispus L., es una planta invasora, considerada como maleza, ya que crece de forma silvestre y se adapta fácilmente. Tradicionalmente se tomaban raíces, hojas y partes aéreas para el tratamiento de enfermedades, tales como: cáncer, tumores, problemas en funciones hepáticas, urinarias y renales. Además, algunas tribus pertenecientes a la Provincia Oriental del Cabo en África usan esta planta medicinal como tratamiento de helmintos, heridas y para detener hemorragias internas (Idris *et al.*, 2017).

En Europa, *Rumex Crispus* L., es una planta cuyo uso es variado, se incluye como ingrediente para recetas culinarias en ensaladas, las hojas tiernas se consumen crudas como verdura, de preferencia las que son recolectadas en la estación de primavera (Saoudi *et al.*, 2021). Actualmente, científicos se centran en el estudio de metabolitos que tiene el género *Rumex*, encontrándose 200 especies para uso farmacológico, fitoquímico, con el fin de identificar su potencial terapéutico (Vasas, Orbán, & Hohmann, 2015).

La producción de metabolitos secundarios ha incrementado en los últimos años debido al gran interés por su investigación y aplicación en diferentes campos. *Rumex crispus* L se caracteriza por tener flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos y triterpenos. Las investigaciones acerca de estos metabolitos se han centrado en la regulación metabólica y localización tisular (Majid, Mitra N, & Simin, 2015).

Por lo mencionado, el presente proyecto tiene el objetivo de desarrollar ensayos que permitan la producción de células madre en *Rumex crispus* L, determinando un protocolo para la desinfección y optimización de un medio de cultivo adecuado con el fin de iniciar estudios que conlleven a su aprovechamiento

Objetivos

Objetivo general

Inducir a células madre en hojas de *Rumex crispus* L., utilizando tres concentraciones de Citoquininas y auxinas

Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de desinfección en hojas de *Rumex crispus* L., para la obtención de células madre y su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizando cultivo *in vitro*, en la provincia de Pichincha
- Optimizar un medio de cultivo para la inducción a células madre de *Rumex crispus* L. y su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en la provincia de Pichincha.
- Obtener células madre de *Rumex crispus* L., para su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizando tres concentraciones de 6- Bencilaminopurina (6-BAP) y Ácido indolacético (AIA).

Hipótesis

Las diferentes concentraciones de citoquininas y auxinas inducen a la formación de células madre a partir de hojas en *Rumex crispus* L.

Capítulo II: Marco Teórico

Género *Rumex*

Origen y distribución

Rumex crispus L también denominada “Lengua de vaca” en Latinoamérica, es una planta herbácea dicotiledónea del género *Rumex*, de la familia Polygonaceae, incluye 120 especies aceptadas. Proveniente de Europa, Asia y África, considerada como una planta invasora por encontrarse en todo el mundo (Conabio, 2009). Se adapta a las regiones templadas, pero también hay datos donde se han extendido a tierras altas con climas fríos. Desde áreas ecuatoriales hasta lugares más dispersos en el círculo polar ártico. Su hábitat son los páramos, campos, terrenos baldíos, playas marinas y estuarios (CABI, 2022).

Figura 1

Distribución geográfica de Rumex crispus L. en el Ecuador



Nota: Distribución geográfica regional de *Rumex crispus* L. en el Ecuador.

Clasificación taxonómica

Pertenece al género *Rumex*, nombrado por Carl von Linné en 1753. Este género lo conforman alrededor de 200 especies y se desarrollan en regiones templadas. El término “rumex” proviene del latín jabalina o lanza, debido a que este género posee hojas

puntiagudas. Así mismo, *crispus* proviene del epíteto rizado, haciendo referencia a sus hojas largas y rizadas (CABI, 2022).

Tabla 1

Clasificación Taxonómica de la Especie Rumex crispus L.

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Polygonaceae
Género	<i>Rumex</i>
Especie	<i>Rumex</i> <i>crispus</i> L.

Nota: Datos obtenidos de iNaturalist Ecuador. (s.f).

Características botánicas

La “Lengua de vaca” es una hierba erecta, perenne estacionaria, que crece de manera silvestre con una altura entre 40 a 120 cm de altura. La raíz tiene un tamaño aproximado de 4 cm de ancho y alcanza una profundidad de 150 cm en suelos que permiten penetración profunda. La corona desarrolla hojas en forma de roseta y tallos erectos con hojas alternas (CABI, 2022).

Las hojas son de color verde azulado de peciolo cortos. Sin embargo, las hojas superiores no tienen peciolo o son cortos. Las láminas de las hojas son lanceoladas, rizadas y onduladas, con puntas puntiagudas y con base estrecha. Las flores son racimos con valvas de 3 a 5 mm de largo y ancho de color verde que maduran y cambian a color marrón. Posee semillas polimórficas de 3 a 5 mm de largo y ancho (Conabio, 2009).

Figura 2

Ejemplar de la planta Rumex crispus L.



Nota: Imagen obtenida de Plantnet. (2021).

Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales nace a mediados del siglo XX, donde después de varios estudios se emplearon hormonas vegetales sintéticas en plantas madres. El primer cultivo de tejidos se atribuye al agrónomo e inspector Henri-Louis Duhamel, quien, al hacer publicaciones referentes a la cicatrización de las plantas, luego descubriría que el tejido amorfo descrito se denominaría callo, una masa de células indiferenciadas que crecen desorganizadas e indefinidamente (Suárez, 2020).

El cultivo *in vitro*, analiza la capacidad de crecimiento que tienen las plantas en un ambiente aséptico, así también como sus partes, denominados explantes, que se conforman de: hojas, raíces, meristemos, etc. Se utiliza recipientes de vidrio o plástico con medios de cultivo que contienen los nutrientes necesarios para que la planta crezca. Se toma en cuenta las condiciones de luz y temperatura que son controladas para una mejor optimización (Suárez, 2020).

Tipos de micropropagación *in vitro*

Esta técnica es utilizada para producir un gran número de plantas a partir de un explante. Permite cultivar tejidos, órganos, embriones, entre otros, y obtenerlos de forma rápida. La fase de regeneración de una planta puede darse por embriogénesis directa e indirecta y la organogénesis directa e indirecta (Albarrán *et al.*, 2011).

Organogénesis directa

Proceso de morfogénesis donde se producen brotes o yemas a partir de un explante como meristemas, sin pasar por el estadio de callo. Se producen brotes vegetativos mediante medios de cultivos específicos sin el desarrollo de raíces. Las plantas *in vitro* utilizan esta técnica para mejorar los rangos de multiplicación o producir plantas transgénicas (Gamarra, 2014).

Organogénesis indirecta (callogénesis)

Se da el desarrollo de células indiferenciadas, pasa por el proceso de desdiferenciar y rediferenciar, es decir, callo. El cual, se produce al cultivar explantes cuyo medio de cultivo tiene diferentes niveles de citoquininas y auxinas. Finalmente, se forman brotes y raíces, esta técnica utiliza principalmente protoplastos (Gamarra, 2014).

Callogénesis

La callogénesis es un proceso *in vitro* indirecto utilizado para la producción de células madre. Dichas células también denominadas callo, se pueden obtener de casi cualquier parte de la planta, con frecuencia como resultado de una herida realizada en el explante. Incluye varios grados de diferenciación, las células más jóvenes tienen mayor capacidad de potencialidad en crecimiento y división, en medios de cultivo especiales son capaces de regenerar órganos y embriones. Los suplementos hormonales para el desarrollo de callos se pueden clasificar de tres maneras: auxina sola, citoquinina sola, auxina y citoquinina (Saurabh *et al.*, 2015). Denominadas células totipotentes. Poseen un suministro de células precursoras que se diferenciarán en tejidos u órganos. Las fuentes principales para la formación de las células madre o callo son los tejidos meristemáticos apicales y

laterales, tejidos que se encuentran en la planta. Poseen la capacidad de diferenciarse y autorrenovarse, no pasan por el proceso de envejecimiento y senescencia. Se diferencian y forman células especializadas y no especializadas (Aggarwal *et al.*, 2020).

Embriogénesis directa

Permite la regeneración en plantas *in vitro* a partir de la formación de embriones somáticos, son morfológicamente y fisiológicamente similares a los cigóticos, no requieren que se forme callo, da como resultado una planta completa. Se utilizan granos de polen que forman embriones haploides o diploides (Alva, Chico, & Cerna, 2013).

Embriogénesis indirecta

Implica una inducción a callo, previo a la formación del embrión, así las células siguen la vía embriogénica. Los explantes que se pueden utilizar son: protoplastos, hojas, tallos y raíces. Al tener el callo no organizado, este posee la capacidad de dividirse y organizarse para formar pro-embriones. Los pro-embriones pasan a ser embriones y al interactuar con ciertas concentraciones de auxinas formarán una planta completa (Albarrán *et al.*, 2011).

Factores que influyen en la propagación in vitro

Los factores que influyen en la propagación *in vitro* son: explante, planta madre, condiciones físicas y medio de cultivo. El principal factor es el explante, puesto que será el tejido u órgano de la planta deseada que se introducirá en el medio de cultivo para llegar al objetivo planteado. Se debe tomar en cuenta el explante más joven al momento de la toma de muestra. De ello dependerá un apropiado crecimiento (Roca & Mroginski, 1993).

La planta madre, de donde se obtiene el explante debe cumplir con ciertas características: estar sana, libre de cualquier enfermedad, libre de cortes y quemaduras. Además, la edad de la planta y sus características también influyen, en cultivo *in vitro* las plantas serán genéticamente iguales a la planta madre (Hartmann & Kester, 1981).

Los microorganismos que interfieren en la salud de la planta son un factor importante en la propagación *in vitro*, un ejemplo, es el hongo característico de esta especie *Rumex crispus* L., que se denomina *Uromyces rumicis*, perteneciente a la familia Pucciniaceae, responsable de las lesiones en tallos y hojas, mismo que da un color rojizo en las zonas infectadas. Al no realizarse una correcta desinfección o escoger plantas visiblemente sanas pero contagiadas con dicho hongo, afectaría en los resultados esperados, puesto que el explante seguiría contaminado (Gautam *et al.*, 2022).

Figura 3

Hongo Uromyces rumicis en hojas de Rumex crispus L.



Nota. Se observa la coloración rojiza que muestra el hongo *Uromyces rumicis* en hojas de *Rumex crispus* L., (J.K.Lindsey, 2015).

Dentro de los factores físicos se encuentran la temperatura y la luz. El rango de temperatura de incubación para lograr el crecimiento es de 20 °C a 24°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Cada especie y tipo de explante tendrá una adaptación diferente y estas características ayudarán a que la planta logre la diferenciación (George, Hall, & Klerk, 2007).

Por último, el tipo de medio de cultivo que se utilizará también es importante y son: solido, semisólido o líquido. Cada especie y tipo de explante requiere de diferente composición nutricional, así como también varían las concentraciones de los mismos. Los

medios de cultivo están compuestos de macro y micronutrientes, vitaminas, sales inorgánicas, carbohidratos, reguladores de crecimiento, agente gelificante y agua (Roca & Mroginski, 1993).

Generalidades

Para seguir con el proceso del cultivo *in vitro*, es necesaria la desinfección del explante seleccionado. La desinfección va a variar dependiendo de la planta y el tipo de explante. Se utilizan diferentes descontaminantes como es el hipoclorito de sodio, etanol, cloruro de mercurio, cetrimida, etc. En este proceso se eliminarán microorganismos que intervengan en el crecimiento *in vitro* de la planta (Borges *et al.*, 2009).

A continuación, los explantes que han sido previamente desinfectados son introducidos en medios de cultivo que han sido estandarizados, los mismos que contienen vitaminas, carbohidratos, agentes solidificantes, reguladores de crecimiento y un pH ideal a condiciones controladas (Gutierrez & Gonzales, 2019)

Medios de cultivo

El medio de cultivo depende de cada planta, variando la concentración de hormonas y suplementos. En general se compone de macro, micronutrientes, suplementos orgánicos (vitaminas y carbohidratos) y reguladores de crecimiento. Los más utilizados son: Knop, Murashige & Skoog (MS), Gautheret, White, Gamborg (B5) y De Fossard. Dentro de los macronutrientes principales que servirán para alcanzar un crecimiento adecuado son: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio y azufre. Entre los micronutrientes más utilizados se encuentran el hierro, manganeso, zinc, cobre, boro y molibdeno (Perea *et al.*, 2009).

La fuente de carbono puede estar en forma de azúcares simples o complejos. La sacarosa es la fuente de carbono y carbohidratos que más se utiliza hoy en día, considerada como una fuente importante de energía para la planta, se compara con la savia que se encuentra en el floema. Cada explante, así como el tipo de planta necesita de una concentración diferente en el medio de cultivo (Zahara *et al.*, 2017).

Los reguladores de crecimiento son moléculas que tienen efecto en el desarrollo de la planta, se encuentran en bajas concentraciones, además, se producen endógenamente ciertos reguladores para realizar procesos bioquímicos y morfológicos. Por lo tanto, utilizar reguladores en el medio de cultivo es necesario, ya que, dependiendo de la finalidad se utilizarán las concentraciones apropiadas (Perea *et al.*, 2009).

El agar es un agente gelificante que funciona como superficie semisólida y hace de soporte para el crecimiento del explante, después de haber medido el pH del medio de cultivo se agrega como último paso el agar. Finalmente, se autoclavan los medios de cultivo que están listos para la introducción de explantes (Singh, 2021).

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento pueden producirse en algunos organismos o sintetizarse químicamente. Cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos y a nivel celular. Gracias a estos compuestos se ha permitido potencializar los procesos dentro del cultivo *in vitro* (Alcantara *et al.*, 2019).

Las auxinas son un tipo de fitohormonas cuya función es intervenir y dirigir procesos de división, diferenciación y elongación celular, aumento de la dominancia apical, entre otras. Esta hormona se encuentra en organismos vegetales. El cultivo de tejidos es capaz de diferenciar o dar origen algunos órganos como raíces, hojas y tallos. Promueven la inducción y elongación de tallo. Dentro de las auxinas más conocidas están: ácido indolacético (AIA) producida de manera natural, ácido indolbutírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA) (Alcantara *et al.*, 2019).

Ácido indolacético es una auxina con fórmula molecular $C_{10}H_9NO_2$, se encuentra en las plantas superiores, involucrado en el desarrollo de las plantas, interviene en algunos procesos fisiológicos como el alargamiento y división celular, fototropismo, diferenciación de tejidos, es un agente importante para la formación del xilema y floema (Vega *et al.*, 2016).

De igual manera, las citoquininas son fitohormonas derivadas de la adenina, tienen la capacidad de estimular e inducir la división celular, raíces y activar la senescencia de las hojas. Cumple un rol importante en la generación de brotes, las citoquininas se producen en la punta de la raíz y se transportan hacia las hojas (Castillo *et al.*, 2019).

6-Bencilaminopurina (6-BAP) es una citoquinina obtenida sintéticamente, de primera generación. Su nombre químico es F-fenilmetil-1H-purin-6-amina, cuya fórmula empírica es $C_{12}H_{11}N_5$. Dentro de sus funciones están: promover el crecimiento de las plantas, estimula la división celular, brotes laterales, formación de brotes basales, floración, entre otros (Alcantara *et al.*, 2019).

Capítulo III: Metodología

Fase de campo

Ubicación geográfica del área de muestreo

Las plantas se obtuvieron en la zona de Fajardo (-0.32673359653355166, -78.4773574392652), las cuales se mantuvieron con un control fitosanitario con fungicida Phyton (procedencia: Ecuador) 1% 2 veces por semana.

Fase de Laboratorio

Selección del explante

Se seleccionaron hojas visualmente sanas y jóvenes. Las hojas tenían 10 días desde su brotación. Se utilizó papel toalla humedecido para cubrir la muestra en una hielera y se trasladó al laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. En el laboratorio, se mantuvieron a los explantes en refrigeración.

Desinfección de hojas de *Rumex crispus* L.

Las hojas fueron lavadas con agua corriente durante 1 minuto. Seguido, se colocaron los explantes en la solución de detergente al 2% por 15 minutos, en agitación constante y al finalizar se realizaron lavados con agua corriente. Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de Phyton fungicida al 1% y Tween 20 10 gotas por litro con agitación constante durante 10 minutos. El lavado se realizó con agua corriente. El último tratamiento que se aplicó fue una solución de hipoclorito de sodio como se indica en la Tabla 2. Los últimos enjuagues se realizaron en cámara con agua destilada estéril.

Tabla 2

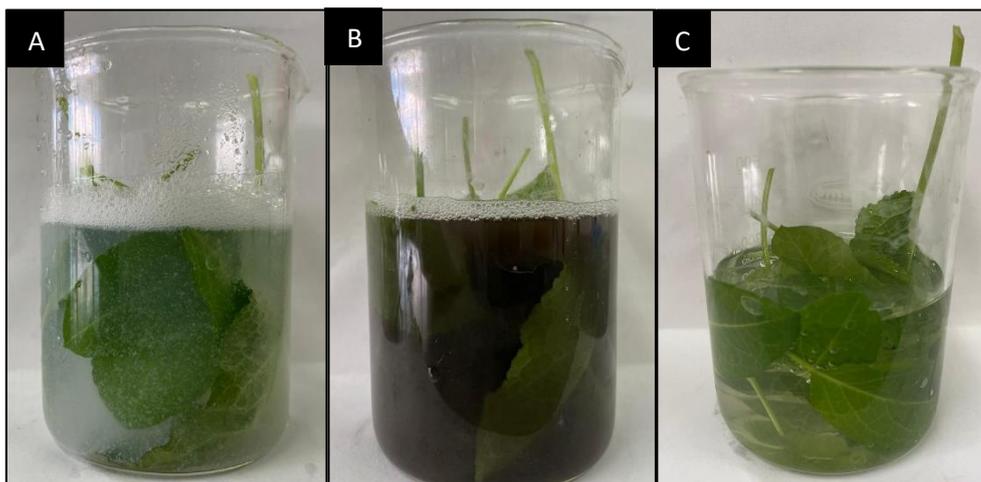
Diseño experimental del protocolo de desinfección para hojas de Rumex crispus L.

Tratamiento	Concentración de hipoclorito de sodio (%v/v)	Tiempo (minutos)
T0	0	0
T1	4	3
T2	5	3
T3	6	3

Nota: La tabla indica las concentraciones de hipoclorito de sodio que se utilizaron y el tiempo de duración.

Figura 4

Protocolo de desinfección en hojas de Rumex crispus L.



Nota. A) Explantes expuestos a una solución de detergente 2% (p/v), B) Hojas de *Rumex crispus* L. sumergidas en una solución de fungicida (Phyton) 1% con 0.5 mL/L de Tween 20, C) Muestra expuesta en una solución de hipoclorito de cloro según tabla 2.

Evaluación: Se realizó en una cámara de flujo laminar ESCO (SHC 4A2), utilizando un medio de cultivo semisólido con sales de Murashige & Skoog, 1962 (MS), para esta

etapa se utilizó 30 g/L de sacarosa comercial y 2,1 g/L de gelificante (Phytigel), se depositó el medio de cultivo semisólido en 30 frascos, con 30 mL cada uno, cada frasco contiene una capacidad de 250 mL. Se colocaron 4 explantes por frasco. Una vez terminada la siembra, se colocaron los frascos en la sala de incubación, cuya temperatura del ambiente es de 21 ± 2 °C, con luz natural. A los 14 días de cultivo se evaluó el porcentaje de contaminación.

Optimización del medio de cultivo

En la etapa de optimización se determinó la viabilidad del explante para lo cual se utilizaron dos tratamientos que consistieron: el primero con sales MS a la mitad de su cantidad de concentración y el segundo con sales MS concentración completa, se utilizó la cantidad de 15 g de sacarosa comercial, pH 5,7-5,8 y gelificante (Phytigel) 2,1g/L para MS 1/2, mientras que para MS completo se utilizaron las concentraciones completas, al igual que en el acápite anterior, se dispensó 30 mL de medio de cultivo semisólido por frasco, en frascos con capacidad de 250 mL. Se colocaron 4 explantes en cada frasco. Al terminar la siembra se colocaron las muestras en la sala de incubación. A los 14 días de cultivo se evaluó la viabilidad y la presencia o ausencia de células madre.

Inducción a células madre a partir de hojas de Rumex crispus L.

Se utilizó una cámara de flujo laminar, medio de cultivo semisólido con el resultado del mejor tratamiento del acápite anterior y suplementado con MS, 2,1 g Phytigel como agente gelificante, 3% de sacarosa comercial, pH 5,7-5,8 y suplementado a diferentes concentraciones de 6- Bencilaminopurina (6-BAP) y Ácido indolacético (AIA) como se indica en la tabla 3. La siembra se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 250 ml conteniendo 3 mL de medio de cultivo semisólido cada uno, con 4 explantes cada uno. Una vez que se terminó el proceso de inducción se llevaron las muestras a la sala de incubación. Se evaluó la presencia de células madre y su desarrollo a los 7 y 49 días.

Tabla 3

Medio de cultivo para la inducción a células madre en hojas de Rumex crispus L.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	
	6-BAP (mg/L)	AIA (mg/L)
T0	0	0
T1	1	0,39
T2	2	0,78
T3	3	1,17

Nota: La tabla muestra los tratamientos que se utilizaron para la inducción a callo a partir de hojas de *Rumex crispus* L. Se hicieron tres repeticiones de cada tratamiento.

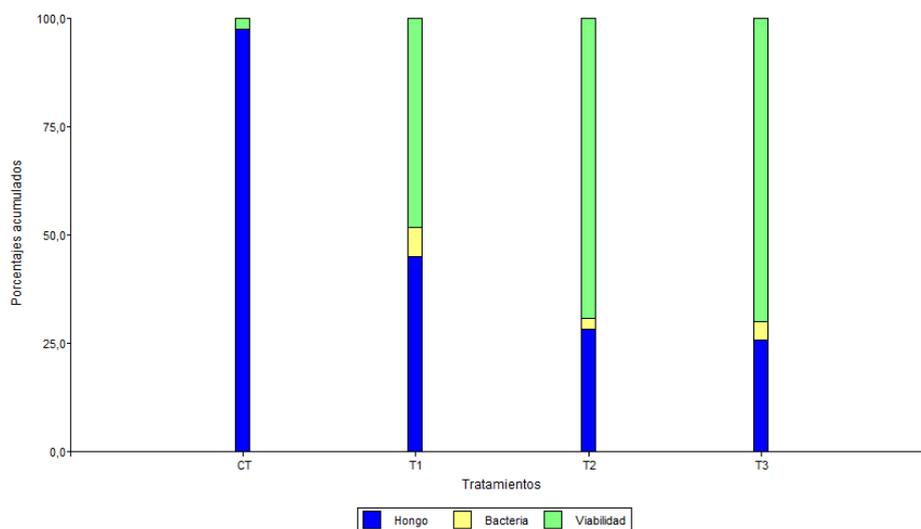
Capítulo IV: Resultados

Desinfección de hojas de *Rumex crispus* L.

Al obtener una menor contaminación, el mejor resultado corresponde al tratamiento dos (T2) con un porcentaje de contaminación de 19%, seguido del tratamiento 3 (T3) con un porcentaje de 29%, a continuación, el tratamiento 1 (T1) obtuvo un porcentaje de 45% y finalmente el control (T0) dio como resultado un porcentaje de 99% (figura 5). Los microorganismos que se encontraron dentro de la contaminación fueron hongo y bacteria (figura 6).

Figura 5

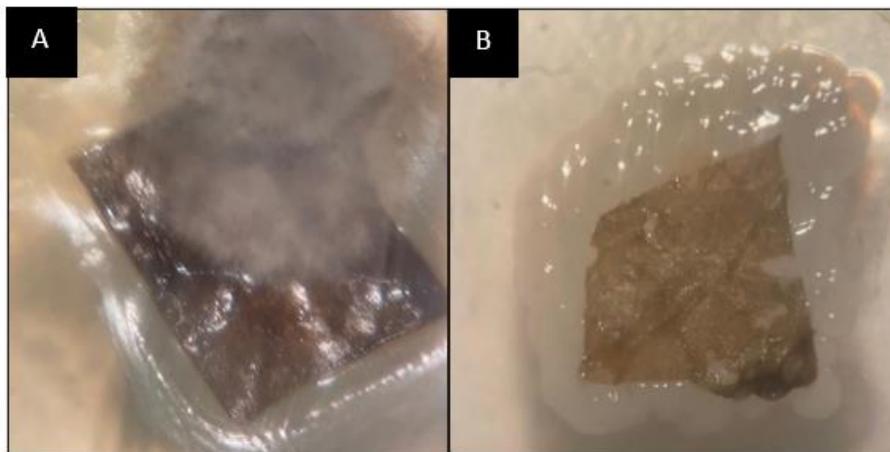
Gráfico correspondiente a contaminación, necrosamiento y viabilidad a los 15 días de cultivo de hojas en *Rumex crispus* L.



Nota: Análisis de contaminación (hongo y bacteria) y viabilidad.

Figura 6

Representación gráfica de contaminación fúngica y bacteriana en los explantes de Rumex crispus L.



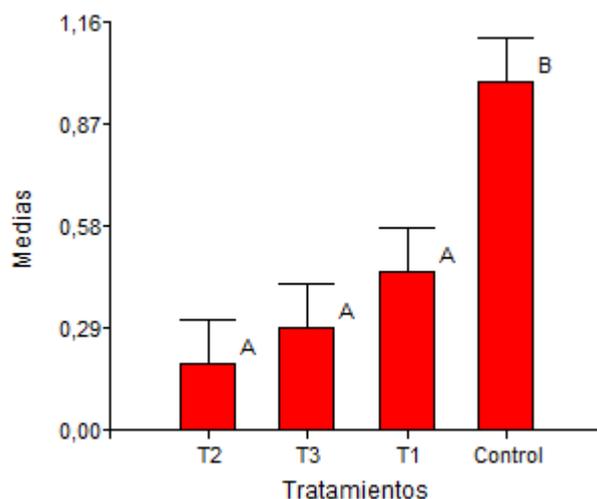
Nota: Se muestra en A) Presencia de contaminación por hongo a los 7 días de siembra de los explantes. En la imagen B) Presencia de contaminación por bacteria a los 7 días de siembra.

Se analizó el efecto de los tratamientos de desinfección sobre las variables dependientes: contaminación. Dentro del análisis de la normalidad dio un valor $p=0.0927$, lo que indica que los resultados siguen una distribución normal.

Los resultados para el análisis de la varianza por Duncan muestran que los tratamientos no son significativamente diferentes. Se formaron dos grupos: A y B, el grupo A pertenece a los tratamientos 1,2 y 3 (figura 7).

Figura 7

Análisis de varianza de Duncan para contaminación a los 14 días de inducción en hojas de *Rumex crispus* L.



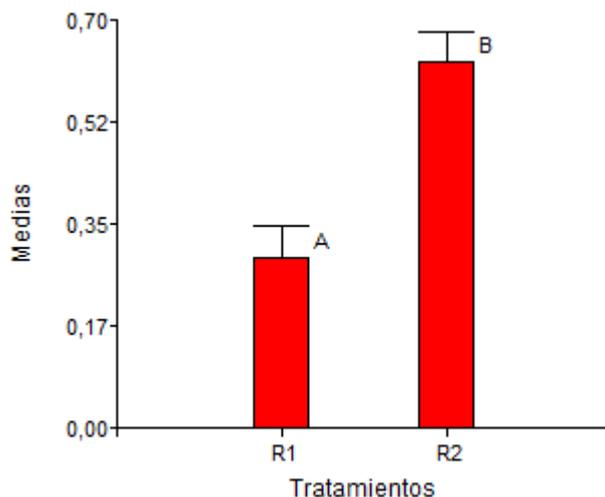
El mejor tratamiento corresponde al tratamiento 2, con una viabilidad de 50.83% y una media de 0.19

Optimización del medio de cultivo

Para la optimización del medio de cultivo se analizó la viabilidad obtenida en el medio de cultivo semisólido MS. En los resultados del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ se observó a los 7 días una viabilidad del 100%, mientras que a los 14 días de cultivo se presentó una viabilidad del 29%. Mientras que la viabilidad en MS completo obtuvo un porcentaje de 62%. El análisis de normalidad obtuvo un valor $p=0,1216$, lo que significa que sigue una distribución normal.

Figura 8

Análisis de varianza de Duncan para optimización del medio de cultivo a los 14 días de inducción en MS $\frac{1}{2}$ y MS completo de *Rumex crispus* L.



Nota. R1, correspondiente a MS $\frac{1}{2}$ con una media igual a 0,29 y R2 correspondiente a MS completo igual a 0,62.

Inducción a células madre a partir de hojas de *Rumex crispus* L.

Se realizó una prueba para determinar normalidad (Shapiro Wilks), cuyo valor $p=0,0013$, lo que indica que no sigue una distribución normal (tabla 4). Para lo cual, se probó un análisis de varianza no paramétrica (Kruskal Qallis) que se observa en la tabla 5, dando un valor $p=0,045$, indicando que los tratamientos no siguen distribuciones iguales. El mayor valor de la media corresponde al tratamiento 3 con una media igual a 0,87, seguido por el tratamiento 2 cuya media fue de 0,80. Finalmente el tratamiento 1 obtuvo una media de 0,62.

Tabla 4

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para inducción de células madre en hojas de Rumex crispus L.

Tiempo de evaluación	Valor p
49 días	0,0013

Nota. Se indica el valor $p= 0,0013$ en un tiempo de 49 días después de la inducción a callo en hojas de *Rumex crispus L.*

Tabla 5

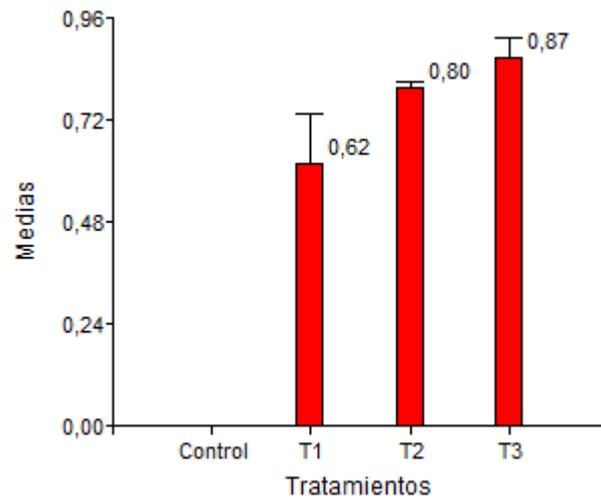
Análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para inducción de células madre en hojas de Rumex crispus L.

Tratamientos	Media	Valor p
T0	0	0,0451
T1	0,62	
T2	0,80	
T3	0,87	

Nota. Se muestran los tratamientos: control (T0), tratamiento 1 (T1), tratamiento 2 (T2) y tratamiento 3 (T3). Con medias de: 0, 0,62, 0,80 y 0,87 correspondientemente.

Figura 9

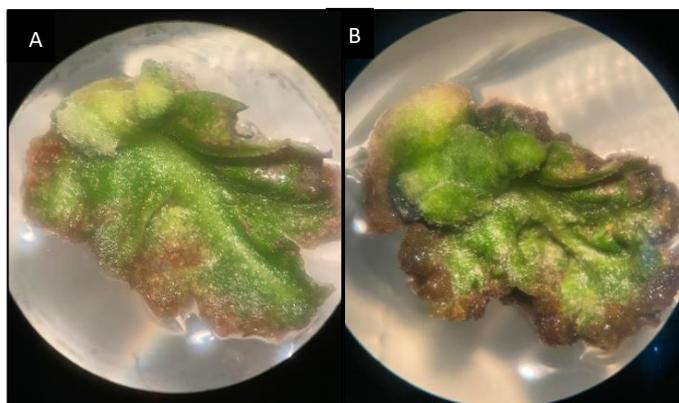
Diagrama de barras de las medias de cada tratamiento utilizado en la inducción de células madre en hojas de *Rumex crispus* L.



Nota. El diagrama indica que la media más alta de porcentaje de inducción a callo corresponde al tratamiento 3 (T3).

Figura 10

Proceso de inducción a callogénesis in vitro a partir de hoja de Rumex crispus L en el transcurso de 49 días.

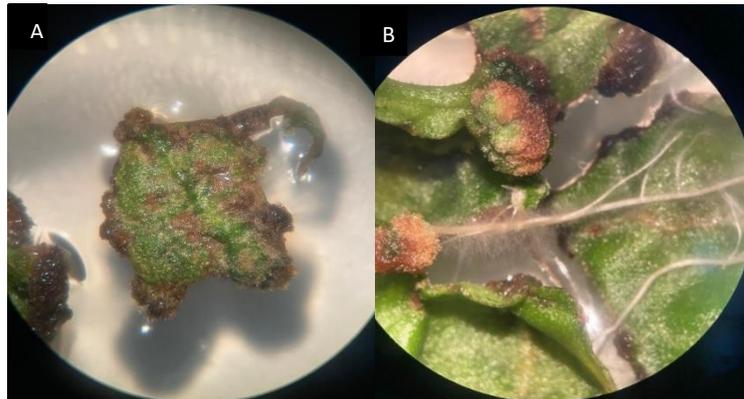


Nota. Se indica el proceso de desdiferenciación celular A) Día 7 de cultivo, el color comienza a cambiar al igual que su morfología, empieza la formación de células madre, B) Día 49 de cultivo, las células madre comienzan a formarse en un 30%, presenta un color café. Las imágenes fueron tomadas en un estereoscopio con aumento 0,63x.

Observando los resultados el tratamiento 3 presenta los mejores resultados, puesto que presenta un mayor porcentaje de inducción a células madre.

Figura 11

Raíces adventicias en células madre de Rumex crispus L.



Nota. A) Células madre, B) Raíces adventicias de color blanco en células madre a partir de hoja de 22 días de siembra en *Rumex crispus* L.

Capítulo V: Discusión

Desinfección de hojas en *Rumex crispus* L.

La desinfección es fundamental en el cultivo *in vitro* para poder eliminar microorganismos que se encuentran en la superficie del explante. Se utilizan soluciones de desinfección como detergentes, fungicidas, hipoclorito de sodio y etanol (Herández & González, 2010). En la investigación realizada se aplicó distintas concentraciones de hipoclorito de sodio; donde, el mejor resultado, con un porcentaje de explantes libres de contaminación, fue del 81% perteneciente al tratamiento 2, correspondiente a hipoclorito de sodio al 5%. En un estudio realizado en el año 2017 por Tabin y colaboradores en *Rheum emodi* Wall, se utilizó detergente Extran al 0.5%, Tween 20 en el cual se empleó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio; donde se obtuvo un porcentaje de explantes libres de contaminación del 10%, con una concentración al 10% de hipoclorito de sodio. Lo que demuestra que el hipoclorito de sodio sirve como un agente desinfectante en combinación, debido a tiene una fuerte propiedad oxidante que lo hace altamente reactivo con aminoácidos, ácidos nucleicos, aminas y amidas, siendo así altamente efectivo contra bacterias, hongos y virus (Yildiz *et al.*, 2012).

Se observaron dos tipos de microorganismos dentro de la contaminación: hongo y bacteria, con un porcentaje de 33, 06% y 4, 44% respectivamente. Gautam y sus colaboradores en 2022, en su investigación mencionaron que el hongo *Uromyces rumicis* amenaza a la especie *Rumex crispus* L., perteneciente a la familia Pucciniaceae. Este hongo presenta la característica de dar una tonalidad rojiza que se observa en las lesiones en tallos y hojas. Además, existen factores como: las fuertes lluvias, el cambio de temperatura y la humedad que aumentan la severidad de esta enfermedad en la planta “Lengua de vaca”. La desinfección ayuda a eliminar ciertos microorganismos, pero no en su totalidad, por ende, la contaminación mostrada en los explantes se debe a este hongo característico de la especie, como se observa en la figura 3.

En otro estudio, Hernandez & Gonzáles en el 2010, encontraron que la contaminación por bacteria es influenciada por el área de trabajo, corrientes de aire, partículas de aire cargadas de esporas y células de microorganismos que penetran en el aire acondicionado o son transportados por el operador y permanecen en el ambiente. Esta multiplicación de microorganismos se debe al tipo de planta y las condiciones climáticas en las que se encuentre.

Optimización del medio de cultivo

En cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, la composición del medio de cultivo es el factor determinante que influye en el resultado final, por ende, es importante investigar la viabilidad que se obtiene al variar las concentraciones de sales MS a la mitad y completo. Por lo cual, en esta investigación se determinó el porcentaje de viabilidad en el medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ y MS completo. Se obtuvo una viabilidad del 29 % en MS $\frac{1}{2}$ y 62% en MS completo después de 14 días de cultivo. Siendo el mejor resultado el medio de cultivo con MS completo. Rezali y sus colaboradores en 2017, indicaron que las diferentes concentraciones de sales MS intervienen en el crecimiento y desarrollo de brotes, observando una mayor producción en el medio que contenía las sales de MS completo, a diferencia de las sales con concentración a la mitad de MS.

Las sales MS aportan con minerales importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, proporcionando macronutrientes (calcio, magnesio, nitrógeno, potasio, fósforo y azufre) y micronutrientes (cobre, hierro, zinc, cloro, boro, manganeso y molibdeno) necesarios para la morfogénesis y organogénesis óptimas. Se han reportado casos de trastornos fisiológicos y/o toxicidad por su deficiencia en la composición inorgánica de los medios de cultivo (Hameg *et al.*, 2020). Esto demuestra que la viabilidad puede variar dependiendo de la concentración que se utilice de MS, lo cual se comprobó en este estudio que la concentración de medio MS completo presenta mejores resultados en la especie *Rumex crispus* L., a comparación con MS $\frac{1}{2}$ (Figura 8).

Inducción a células madre a partir de hojas de *Rumex crispus* L.

El cultivo *in vitro* se aplica, frecuentemente en plantas medicinales para su propagación masiva, producción e incremento de metabolitos secundarios y mejora genética. Las plantas naturalmente poseen concentraciones bajas de reguladores de crecimiento, en el cultivo *in vitro* se aplican las concentraciones ideales para poder obtener el objetivo deseado. Las auxinas por lo general, se encuentran acompañadas de citoquininas a concentraciones similares para obtener una proliferación de células no diferenciadas (Alcantara *et al.*, 2019).

La investigación presente, desarrolló un protocolo de inducción a células madre a partir de hojas en *Rumex crispus* L., una planta medicinal con fines terapéuticos. Se emplearon diferentes concentraciones de 6-BAP y AIA. Donde a las 7 semanas de siembra, se obtuvo que el mayor porcentaje de inducción a callo fue de 87%, empleando 3 mg/L de 6-BAP + 1,17 mg/L AIA. Los resultados difieren con el estudio realizado por Tabin y sus colaboradores en el 2017, donde a las 12 semanas de cultivo el mayor porcentaje de formación de callo en los explantes (hojas) de *Rheum emodi* Wall., fue de 70%, utilizando 10 μ M de 6-BAP + 5 μ M de AIA.

En la morfología del callo se observó raíces adventicias en explantes como se observa en la figura 11. A la cuarta semana de cultivo, los explantes presentaron raíces adventicias de tonalidad blanca. Según Chen y sus colaboradores (2014), determinaron la capacidad de los explantes de hoja en la formación de raíces adventicias durante el proceso de obtención de callo, para lo cual, señalaron que la formación de raíces adventicias a partir de hoja se encuentra influenciado por la edad de la hoja y ciertos reguladores de crecimiento encontrados en el medio de cultivo. Además, mencionaron que las hojas más jóvenes contienen mayor cantidad de auxinas endógenas, generando mayor cantidad de raíces adventicias a comparación de las hojas maduras.

Capítulo VI: Conclusiones

Se estandarizó el protocolo de desinfección en hojas de *Rumex crispus* L., para la obtención de células madre. El mejor tratamiento obtenido corresponde al tratamiento 2, el cual se conforma de: detergente al 2% por 15 min, fungicida al 1% por 10 min, hipoclorito de sodio al 5% por 3 min, con un porcentaje del **81%** de explantes libres de contaminación.

Se optimizó un medio de cultivo semisólido para la inducción a células madre de *Rumex crispus* L., donde el mejor tratamiento obtenido corresponde al tratamiento 2 que pertenece al medio de cultivo con sales MS concentración completa, con un porcentaje de viabilidad del **62%**.

Se obtuvo células madre a partir de hojas de *Rumex crispus* L., con un porcentaje de inducción a callo del **87%** en el mejor tratamiento, perteneciente al tratamiento 3, con las concentraciones de: 3 mg/L de 6-BAP + 1,17 mg/L AIA.

Capítulo VII: Recomendaciones

Es importante realizar la recolección del material vegetal en zonas con diferentes condiciones climáticas y seleccionar las hojas visiblemente sanas y jóvenes para analizar si su viabilidad aumenta.

Se recomienda utilizar un mayor porcentaje de fungicida Phyton, el cual reduce la cantidad de agentes patógenos como hongos dentro del protocolo de desinfección de hojas de *Rumex crispus* L.,

Se sugiere utilizar la combinación de diferentes reguladores de crecimiento como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que ayuden a determinar la formación de células madre en la especie *Rumex crispus* L.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Aggarwal, S., Sardana, C., Ozturk, M., & Sarwat, M. (2020). Plant stem cells and their applications: special emphasis on their marketed products. *3 biotech*, 10(7), 2091. doi:<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02247-9>
- Albarrán, J., Fuenmayor, F., Fuchs, M., Martínez, G., Rodríguez, A., Manzanilla, E., . . . Torrealba, M. (2011). Estrategias biotecnológicas para la conservación de germoplasma en el INIA-CENIAP Venezuela. Caso yuca y musáceas. *Agronomía Tropical*, 61(1), 85-94.
- Alcantara, J., Acero, J., Alcántara, J., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *DOAJ: Directory of Open Access Journals – DOAJ*, 17(32), 109-129. doi:<https://doi.org/10.25058/24629448.3639>
- Alva, B., Chico, J., & Cerna, L. (2013). Induction of somatic embryos from leaves *Capsicum chinensis*, using different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzyl amino purine. *SCIÉND0*, 16(2), 15950.
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127-135.
- BUAP. (2017). "*Lengua de Vaca*", planta medicinal para tratar enfermedades bucales. Obtenido de <https://www.buap.mx/content/%E2%80%9Clengua-de-vaca%E2%80%9D-planta-medicinal-para-tratar-enfermedades-bucales>
- CABI. (2022). *Rumex crispus* (curved dock). Obtenido de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/48059>

- Calva, J., & Pérez, G. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1-16.
- Castillo, L., Maldonado, J., Alonso, Á., & Carranza, C. (2019).). Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación in vitro de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). *Biotecnia*, 22(1), 32-38.
doi:<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1122>
- Chen, Q., Sheng, L., Huang, H., & Xu, L. (2014). A simple method suitable to study de novo root organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 5.
doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00208>
- Conabio. (2009). *Rumex crispus* L. Obtenido de
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/polygonaceae/rumex-crispus/fichas/ficha.htm>
- Gamarra, L. (2014). *Regeneración in vitro vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de Gmelina arborea a partir de plantas in vitro*. Obtenido de
<http://hdl.handle.net/10554/15436>.
- Gautam, A., Avasthi, S., Verma, R., Sushma, M., Devadatha, B., Jayawardena, R., . . . Kurunarathna, S. (2022).). A Global Overview of Diversity and Phylogeny of the Rust Genus *Uromyces*. *Journal of Fungi*, 8(6), 633. doi:<https://doi.org/10.3390/jof8060633>
- George, E., Hall, M., & Klerk, G. (2007). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer Netherlands, 1(3), 1-503. doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Gutierrez, A., & Gonzales, P. (2019).). Growth regulators for in vitro culture of three grapevine rootstocks (*Vitis vinifera* L.) used in the pisco industry. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 461-468. doi:<https://doi.org/10.17268/sci.agopecu.2019.04.02>

- Hameg, R., Arteta, T., Landin, M., Gallego, P., & Barreal, M. (s.f.). Modeling and Optimizing Culture Medium Mineral Composition for in vitro Propagation of *Actinidia arguta*. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.554905>
- Hartmann, H., & Kester, D. (1981). Propagación de plantas. Principios y Prácticas. CECSA.
- Herández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos tropicales*, 31(4),00.
- Idris, O., Wintola, O., & Afolayan, A. (2017). Phytochemical and antioxidant activities of *Rumex crispus* L. in treatment of gastrointestinal helminths in Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1071-1078. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.008>
- Idris, O., Wintola, O., & Afolayan, A. (2019). Evaluation of the Bioactivities of *Rumex crispus* L. Leaves and Root Extracts Using Toxicity, Antimicrobial, and Antiparasitic Assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-13. doi:<https://doi.org/10.1155/2019/6825297>
- J.K.Lindsey. (2015). *Uromyces rumicis*. Obtenido de Comanster: <https://www.commanster.eu/Commanster/Fungi/Basidio/SuBasidio/Uromyces.rumicis.html>
- Majid, M., Mitra N, & Simin, H. (2015). Establishment of In vitro Adventitious Root Cultures and Analysis of Flavonoids in *Rumex crispus*. *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 25(1), 63-70.
- Perea, M., Campos, H., Guillot, G., & Cogua, J. (2009). *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Rezali, N., Jaafar, N., Saleh, A., Osman, N., & Mohd, N. (2017). The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on in vitro growth of *Typhonium*

- flagelliforme. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 151-156.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.019>
- Roca, W., & Mroginski, K. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. En C. I. Tropical. Colombia: CIAT.
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 21-22. doi:<https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Saoudi, M., Bouajila, J., Rahmani, R., & Alouani, K. (2021). *Phytochemical Composition, Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, and Cytotoxic Activities of Rumex crispus L.*
doi:<https://doi.org/10.1155/2021/6675436>
- Saurabh, B., Kiran, S., Randhir, D., & Tanmoy, B. (2015). Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. En *Plant Tissue Culture* (págs. 31-107). Elsevier Science.
- Singh, A. (2021). *How to make tissue culture agar*. Obtenido de <https://www.plantcelltechnology.com/blog/how-to-make-tissue-culture-agar/>
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de tejidos Vegetals (Vol 1)*. Obtenido de Fondo Editorial Universidad de Córdoba:
<https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro%20Cultivo%20de%20Tejidos%20Vegetales%20Edici%C3%B3n%2003-03->
- Tabin, S., Kamili, A., Gupta, R., Parray, J., & Bansal, A. (2017). In Vitro Culture of *Rheum emodi* Wall: An Endangered Medicinal Plant of Northwestern Himalaya. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(3), 995-1006. doi:<https://doi.org/10.1007/s40011-016-0835-7>

- Vasas, A., Orbán, O., & Hohmann, J. (2015). The Genus Rumex: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 198-228.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.001>
- Vega, P., Canchignia, H., Gonzáles, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Yildiz, M., Fatih, S., Kahramanogullari, C., & Tuna, E. (2012). The Effect of Sodium Hypochlorite Solutions on the Viability and In Vitro Regeneration Capacity of the Tissue. . *The Natural Products Journale*, 2(4), 328-331.
doi:<https://doi.org/10.2174/2210315511202040328>
- Zahara, M., Datta, A., Boonkorkaew, P., & Mishra, A. (2017). The Effects of Different Media, Sucrose Concentrations and Natural Additives on Plantlet Gowth of Phalaenopsis Hybrid "Pink.". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(0).
doi:<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160149>