
Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ).

Freire. V. Paulina. A., M.Sc. Jadán. Mónica.¹ & Ing. Romero. Pedro.²

¹Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida, PO Box: 171-5-231-B. Sangolquí - Ecuador.

² Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE.

RESUMEN

Esta investigación tiene por objetivo desarrollar un protocolo de establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios. Como primer paso se estandarizó el protocolo de desinfección utilizando NaClO al 1.5% con un tiempo de inmersión de 10 minutos con una efectividad del 90% en viabilidad y 10% de contaminación. Posteriormente, se estableció al medio de cultivo B5 con 0.5 mg.L⁻¹ de TDZ como mejor en la formación de callo. Se establecieron las suspensiones celulares exitosamente con 1g de callo en 20ml de medio líquido en un Elenmeyer de 100ml. Finalmente, se estableció una curva representativa de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioide* y con ella se establece al día 15 como óptimo para la realización de subcultivo y así mantener la suspensión en multiplicación celular constante.

Palabras clave.- *Chenopodium ambrosioide*, suspension celular, paico.

ABSTRACT

This research aims to develop a protocol for the establishment of *Chenopodium ambrosioide* cell suspension in order to obtain secondary metabolites in the future. Firstable, a disinfection protocol was implanted using 1.5% NaClO with an immersion time of 10 minutes as a result we obtain 90% of viability and 10% of contamination. Callus growth on Gamborgs B5 medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ of TDZ. A growth curve in suspension culture was generated on the most favorable culture medium for callus growth. Cell suspensions were successfully establish with one gram of callus in 20 milliliter of liquid medium in a 100 milliliter Elenmeyer. Finally, we get a growth curve from *Chenopodium ambrosioide* in cell suspension and we determinate the 15th day like the best to subculture in order to maintain a constant cell division.

Key word.- *Chenopodium ambrosioide*, cell suspension, paico.

Introducción

Actualmente las plantas son vistas como fuente de una amplia variedad de compuestos químicos naturales, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, nutracéuticos, antioxidantes, pesticidas, colorantes, saborizantes, fragancias y moléculas nuevas (Mulabagal *et al.*, 2003).

La extracción de estos compuestos se lo obtiene normalmente de plantas silvestres o cultivadas; sin embargo, el hábitat donde se desarrollan está siendo afectado o sobre explotado de tal forma que algunas plantas están en proceso de desaparición. Además, Trejo y Rodríguez (2007) señalan que la planta en campo produce los metabolitos secundarios en ciertas fases de su ciclo de vida, en condiciones climáticas específicas o por estrés en células, órganos y tejidos determinados por lo que su producción en forma natural es compleja.

Por estas razones las investigaciones sobre técnicas en obtención, inducción y extracción de metabolitos secundarios sin la utilización de plantas completas ha ido aumentando considerablemente en los últimos años (Pérez, 1998).

En Ecuador *Chenopodium ambrosioides*, cuyo nombre vulgar es paico, es una planta utilizada por varias generaciones cuyos metabolitos secundarios han probado tener actividad nematocida, antifúngica y alelopática. Incluso se considera como valiosa su composición química gracias a que contiene saponinas, geraniol, alcanfor, cimeno, limoneno, terpineno, mirceno, ácido butírico, spinasterol, metil salicilato, sulfatos, fosfatos de magnesio, sapogenina de

quenopodio, ureasa, ascaridol y otros que aún no se han identificado en su totalidad (Blair & Madrigal, 2005). Adicionalmente, se debe destacar el valor nutricional ya que según Corio *et al.* (1998) ha sido posible determinar que por cada 100g de paico se obtiene 342mg de calcio, 8.6mg de hierro, 3.5mg de caroteno, 0.3mg de riboflavina y 99mg de ácido ascórbico.

En *Chenopodium ambrosioides* no existen trabajos de suspensiones por lo que esta investigación tiene como objetivos estandarizar un protocolo de desinfección de entrenudos, establecer un medio apropiado para la inducción de callo, establecimiento de las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* y determinar una cinética celular para las suspensiones obtenidas para una futura obtención de metabolitos secundarios.

Metodología

Material Vegetal

La recolección de plantas de *Chenopodium ambrosioides* se efectuó en la provincia de Tungurahua, ciudad de Ambato, parroquia Terremoto, Ecuador. En el muestreo se seleccionaron plantas jóvenes, completamente sanas y que no presenten lesiones de patógenos externos.

El material vegetal se trasladó con 50% de tierra del lugar y 50% de turba hacia los invernaderos ubicados en las afueras del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí – Ecuador.

Desinfección del material Vegetal

A la planta de invernadero se cortó entre 15cm a 20cm de largo desde la punta superior, luego se retiró todas las hojas junto con las yemas brotadas y se procedió

con un nuevo corte entre 8 cm a 10 cm. A continuación, los explantes fueron lavados con agua corriente por un tiempo de 5 min, para eliminar la mayor cantidad de impurezas y se sumergió en una solución de detergente 1% por 15 min en agitación. Se realizó tres lavados con agua destilada autoclavada y se introdujo los explantes en un fungicida (phyton 0.5%) con dos gotas de tween-20 por cada 100 ml de solución durante 30 min; después se procedió con un lavado en alcohol al 70% por un minuto en agitación y se sumergió los explantes en una solución de hipoclorito de sodio con dos gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución. Se probó con dos concentraciones de hipoclorito de sodio (1% y 1.5%) con tres tiempos de inmersión (10min, 15min y 20min). Acto seguido se lavó los explantes con agua destilada estéril, por tres ocasiones dentro de la cámara de flujo laminar, la cual estuvo previamente esterilizada con alcohol al 90% y radiación ultravioleta durante 15min seguido de un flujo de aire filtrado por 10min. Todo el material utilizado dentro de la cámara estuvo totalmente esterilizado en autoclave por 15 min a una temperatura de 121°C con una presión de 15psi y el proceso de manipulación se realizó con pinzas estériles para evitar cualquier fuente de contaminación. Finalmente, cada explante fue seccionado en segmentos de dos centímetros cada uno y a estos se los hizo un lavado con penicilina 1 000 000UI diluida en 100ml.

Se realizó 10 repeticiones por cada tratamiento teniendo como unidad experimental un explante en un frasco con medio de cultivo.

Los explantes se sembraron en medio MS con humedad relativa del 50% al 60% a una temperatura de 25 °C ± 2 °C bajo un nivel de iluminación de 2000 luxes a 2500 luxes y con un foto período de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Formación de callo

Se utilizó el medio de cultivo B5 determinado por Gamborg *et al.* (1968) con todos sus nutrientes y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) enriquecido con 20 g L⁻¹ de azúcar, 5.5 g L⁻¹ de agar con una regulación de pH 5.7 - 5.8 y suplementado con TDZ (0mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 1.5 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, y 2.5 mg L⁻¹). Se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento. La evaluación se la hizo mediante cuatro niveles de valoración, especificando el valor de 1 para la ausencia de callo y 4 para identificar callo abundante.

Establecimiento de las suspensiones celulares

Una vez determinado el medio de cultivo idóneo para una adecuada producción de callo, se procedió a utilizar el mismo omitiendo el agar. Se transfirió aproximadamente 1 g en peso de callo a un Erlenmeyer estéril de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo idóneo compuesto por líquido B5 mas vitaminas, suplementado con 0.5 mg.L⁻¹ de TDZ, en agitación orbital permanente a 110 rpm incubado a una temperatura de 25°C ± 2°C con una intensidad de luz entre 1500 luxes a 2000 luxes, hasta obtener una densidad celular entre 80 000 a 100 000 células por mililitro. Se hizo un tamizado con una malla mesh N° 50 para tener una suspensión homogénea.

Recuento Celular

Una vez establecida la suspensión celular homogénea se reemplazó el 50% de medio antiguo por medio fresco y se calculó la densidad celular (número de células por mililitro) mediante el conteo directo de células en la cámara Neubauer empleando el método de Lugo (2004), con un microscopio óptico marca Olympus modelo BX-48. Se tomó lecturas de cinco cuadros grandes de la cámara Neubauer, cuatro

esquineros y uno central. El número de células por volumen se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{cell}}{\text{ml}} = \frac{X_c}{V}$$

Donde:

$$X_c = \text{promedio de células contadas}$$

Resultados y Discusión

Mediante el presente trabajo investigativo se consiguió obtener suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides*, siguiendo un proceso que involucra la estandarización del protocolo de desinfección de los explantes, la selección del medio de cultivo apropiado para la inducción de callo, el establecimiento mismo de las suspensiones celulares y la determinación de la curva que representa su cinética molecular.

Desinfección del material vegetal

En este trabajo se observó que cuando aumentaba la concentración de NaClO crecía el porcentaje de explantes no contaminados, lo que concuerda con lo expuesto por Abdelnour y Escalant (1994) quienes afirmaron que mientras más alta la concentración de cloro más efectivo es la desinfección del material vegetal. Hay que recalcar que la concentración NaClO influyen en el nivel de contaminación mas no el tiempo de inmersión, por lo que un aumento del 0.5% en la concentración de NaClO mostrará un explante contaminado frente a 147 no contaminados. Al evaluar la variable contaminación los tratamientos T2 (1% NaClO, 15 min), T3 (1% NaClO, 20 min) y T4 (1.5% NaClO, 15 min) no muestran diferencia por lo que si se desea bajar el costo o la cantidad de utilización del producto se puede utilizar una concentración de 1% NaClO con 15 min o 20

min, por lo contrario si se desea agilitar el proceso se puede utilizar 1.5% de NaClO con 10 min de inmersión. Además, los datos revelan que la concentración de 1.5% generan mayor número de explantes no contaminados por lo que se toma como mejor concentración para eliminación de contaminantes.

Al analizar la variable clorosis los resultados revelan que mientras va aumentando la concentración de NaClO hay mayor número de explantes afectados, esto se debe a que el NaClO puede causar estrés fisiológico por ser un compuesto altamente oxidante para las plantas (Vera, 2004). Además se muestra que si hay un aumento del 0.5% en NaClO por cada explante sin clorosis se obtendrá 100 explantes afectados y por cada 30 segundos más de inmersión se obtendrá 3 explantes afectados por cada explante no afectado. Al evaluar la variable clorosis los tratamientos T2 (1% NaClO, 15 min), T3 (1% NaClO, 20 min) y T4 (1.5% NaClO, 15 min) no muestra diferencia significativa por lo que se puede utilizar cualquiera de estos tratamientos según sea la conveniencia.

Para fines prácticos el análisis estadístico revela como mejor tratamiento de desinfección el T4 con una concentración de NaClO de 1.5% y un tiempo de inmersión de 10 minutos, en el cual se obtuvo el mayor número de explantes no contaminados junto con el mayor número de explantes viables. Este protocolo de desinfección es efectivo porque cumple con una contaminación del 10% siguiendo los parámetros definidos por Cruzat (2010) que afirma que la contaminación debe ser menor al 16.6%. De igual manera se considera adecuado ya que un 90% de explantes viables es valor alto al compararlo con los demás tratamientos ver figura 1. Además, Roca y Mroginski (1993) señalan

que tener cultivos completamente estériles y viables es difícil de lograr, más bien lo que se debe conseguir es un equilibrio entre la menor contaminación, oxidación y clorosis versus una alta supervivencia, capacidad de generación de estructuras y viabilidad.

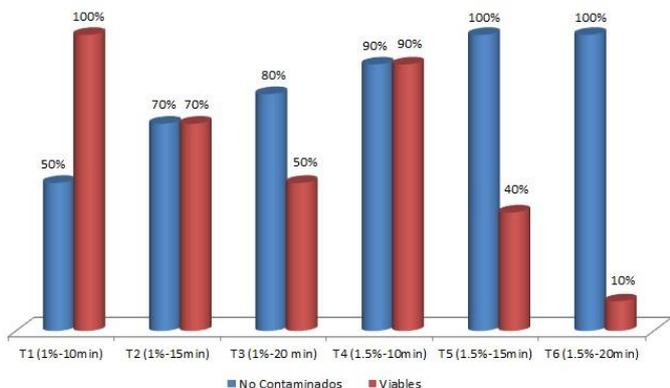


Figura 1. Porcentaje de explantes viables y no contaminados de cada tratamiento aplicado

Formación de callo

La prueba no paramétrica Kruskal - Wallis que exhibe un valor p menor a 0.01% y tres grupos significativamente diferentes. El grupo A corresponde al tratamiento E0 que representa al blanco. El grupo B corresponde a los tratamientos desde E 2, E 3, E 4 y E 5 los cuales son estadísticamente iguales y el grupo C representado con el tratamiento E 1. Finalmente, la prueba de Kruskal - Wallis es concluyente para estos datos mostrando al mejor tratamiento con uno de los tratamientos de desinfección evaluados la media más alta que corresponde el grupo C.

Esta parece ser la primera evidencia de inducción callo de *Chenopodium ambrosioides* con TDZ. Pérez *et al.* 2004 señala que generalmente esta hormona induce la formación de callos y Murthy *et al.* (1998) reporta que el TDZ induce la formación a callo en algunas plantas con mayor efectividad que otros reguladores de crecimiento. En este trabajo se observó que la aplicación de la hormona TDZ en concentración de 0.5 mg L⁻¹ genera la

mayor cantidad de callo respecto a las otras concentraciones estudiadas, lo que concuerda con Gringa (1998) el cual señala que concentraciones mayores a 1µM de TDZ son utilizadas para la formación de callo.

El TDZ ha sido catalogado como una citoquinina por su actividad, no obstante se distingue de otras fitohormonas ya sean naturales o sintéticas y su mecanismo de acción es aún desconocido (Pierik, 1990), sin embargo, esta investigación evidencia que fruto de la formación de callo se debe directamente al TDZ ya que el tratamiento E0 sin hormona no genera reacción alguna sobre el explante. Además los resultados aclaran que con concentraciones mayores a 0.5 mg L⁻¹ de TDZ la formación de callo es ineficiente y no hay diferencia significativa como lo mostró la prueba paramétrica Kruskal - Wallis.

Estudios de Eisa *et al.* (2005) y Milivojevic *et al.* (2005) refieren la formación de callo con la auxina 2,4-D en plantas del mismo género que *Chenopodium ambrosioides* con muy buenos resultados sin embargo estudios previos a este trabajo mostraron que esta auxina generaba una respuesta desfavorable por lo que se vio la necesidad de incursionar en otra hormona como el TDZ. Según Pierik (1990) la inclusión de citoquininas en el medio de cultivo también permite formar callos en varias especies vegetales.

Hay relativamente poca información disponible sobre el tipo de callo inducido por TDZ (Murthy *et al.*, 1998), en este estudio se generó un callo amarillento con algunos matices de color rojizo.

En esta etapa fue útil utilizar el medio B5 determinado por Gamborg (1968) ya que generaba un callo más vigoroso que en el medio de Murashige y Skoog (1962) esto pudiera ser consecuencia de la menor

concentración de nitrato y las distintas fuentes en el medio de cultivo B5, especialmente la ausencia de NH_4NO_3 y KH_2PO_4 y la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NaH_2PO_4 . Además, según Pérez *et al.* (2010) y Blanco (2001) el medio B5 ha sido ampliamente utilizado en el cultivo de células y en la fase de inducción de callo.

Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* se establecieron con 1 g de callo en 20 ml de medio fresco en un Elenmeyer de 100 y una velocidad de agitación de 110rpm. Pérez (2010) indica que cantidad de callo a utilizar puede ser desde 1 g a 20 g en 50 ml de medio de cultivo, recalando que mientras mayor cantidad de inóculo inicial se utilice más rápidamente se podrá establecer el cultivo en suspensión de los tratamientos evaluados

Para las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* generó buenos resultados la utilización de Elenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo fresco como lo indica Roca y Mroginski (1993) se debe utilizar el 1/5 de volumen del frasco a utilizar con medio fresco para que el resto de volumen sirva para el intercambio gaseoso de las células. Además, se utilizó una velocidad de agitación de 110 rpm corroborando lo señalado por González y Gómez (1998) que las suspensiones celulares se los puede mantener a revoluciones de 60 rpm a 150 rpm (Abdelnour & Escalant, 1994).

Durante la multiplicación celular de las suspensiones de *Chenopodium ambrosioides*, se identificó cuatro etapas como se muestra en la figura 2. La primera etapa se caracterizó por un período de crecimiento lento que abarca los primeros cinco días después del subcultivo. Esta etapa se la puede catalogar como una fase de retraso o latencia ya que a pesar de que

existe una división celular esta es baja, según Chawla (2002) en esta fase las células se preparan para dividirse. Sin embargo tener una evidencia de división celular inmediata da indicios de que el establecimiento de las suspensiones celulares fue exitoso y las células han superado la fase de adaptación de células agrupadas en forma de callo y ahora en células libres en forma de suspensión. Seguidamente se observa una segunda etapa que se caracteriza por una fase de crecimiento exponencial, donde la tasa de división es la mayor en todo el proceso y se extiende hasta el día 15. Según Dodds y Lorin (1995) en esta etapa se incrementa la velocidad de división celular donde las células son jóvenes y biológicamente activas. Posteriormente se identifica una tercera etapa la cual se caracteriza por un crecimiento logarítmico que permanece hasta el día 24. A esta fase Gómez (1998) lo define como fase de disminución progresiva señalando que el número de células van agotando uno o varios nutrientes del medio, se pueden generar residuos que sean tóxicos para las células y que las células se obstaculicen mutuamente. Vasili (1982) reporta que existen variaciones en el pH afectando la estabilidad celular. Finalmente, se visualiza una cuarta etapa donde aparentemente las células empiezan una fase estacionaria la cual aparece en el momento que los nutrientes del medio se han agotado y señalando que la suspensión ha alcanzado su máxima densidad celular, estabilizando el número de células y por tanto la concentración celular permanece constante (Pérez, 1998 y Pérez, 2010).

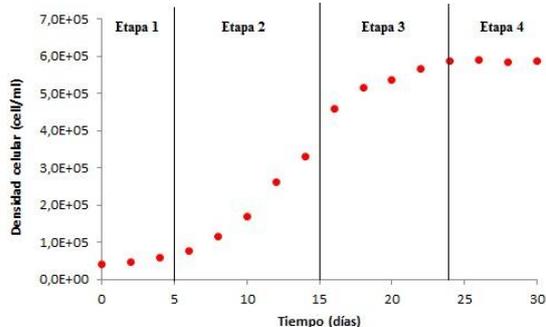


Figura 2: Etapas de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides*

La densidad celular inicial utilizada como límite inferior de $0.4 - 0.5 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ para el presente estudio fue la adecuada ya que se pudo evidenciar rápidamente la fase exponencial bien definida, corroborando lo indicado por Barranco *et al.* (2009) cuando no hay una buena densidad celular inicial la multiplicación suele ser pobre y no se puede mantener un crecimiento celular constante y Torres (1989) que por su parte señala que el establecimiento se puede hacer con una densidad inicial de $0.5 - 2.5 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$, mientras que Navila (2003) considera que la utilización de densidades iniciales de $9 - 10 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$ se las puede catalogar como densidades bajas o críticas.

De la curva de cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* se determinó que el día 15 es el óptimo para el subcultivo, ya que la curva presenta una inflexión, señalando el fin de la última fase de crecimiento exponencial del cultivo celular. Según Barranco *et al.* (2009) este punto es el adecuado para mantener una multiplicación celular continua, de lo contrario las células alcanzan su máxima densidad y permanecerán viables pero sin división para más tarde morir. Gonzáles y Gómez (1998) por su parte señalan que si se realiza un subcultivo en este punto la cinética celular continúa a velocidades logarítmicas sin pasar la fase estacionaria o de disminución progresiva.

El cambio de subcultivo al día 15 también concuerda con el método utilizado por Roitsh y Tanner (1993) con la planta *Chenopodium rubrum* perteneciente a la misma familia que *Chenopodium ambrosioides*.

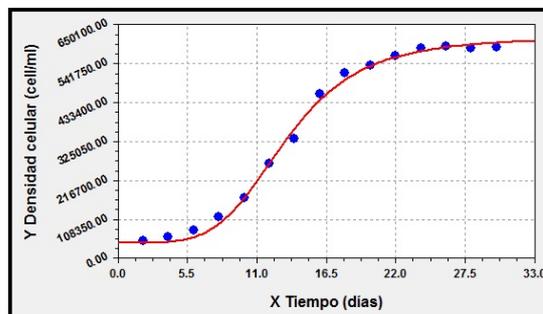


Figura 4: Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para *Chenopodium ambrosioides*

El análisis de regresión mostró una curva sigmoide con la ecuación mostrada a continuación:

$$y = \frac{(4.29 \times 10^4) (9.91 \times 10^4) + (6.15 \times 10^5) X^{4.45}}{9.91 \times 10^4 + X^{4.45}}$$

La tasa específica de crecimiento encontrada fue de $\mu=0.13$ cuyo valor calculado en este estudio para el crecimiento de células en suspensión de *Chenopodium ambrosioides* es similar comparado con algunos valores reportados por Pérez (2010) y que se los muestra a continuación.

Especie	$\mu \text{ (d}^{-1}\text{)}$
<i>Panax ginseng</i>	0.17
<i>Taxus chinensis</i>	0.12
<i>Coffea arabica</i>	0.06
<i>Cantharantus roseus</i>	0.45
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	0.12
<i>Lavandula vera</i>	0.17
<i>Rollinia mucosa</i>	0.10

Bibliografía

Blanco, A. 2010. Preparación de medios de cultivo.

Catillo, A. 2004 Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo.

Lugo, A. 2004. Cámara Thoma y Neubauer. GabLaboratory.

Sathyanarayana, B. 2007. Plant Tissue Culture: Practice and New Experiment Protocols.

Pérez, J. García, L. y Gómez, R. 2004. Formación de callos de *Phaseolus vulgaris*. Biotecnología Vegetal, 4: 233-236.

Foro Argentino de Biotecnología. 1999. Plantas Medicinales en Atención Primaria de Salud, Agroindustria. IICA.

Calva, G. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro.

Albarracín, H. 2009. Métodos biotecnológicos.

Chawla, H. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publisher.

Pérez, J. 2010. Evaluación de la producción de fotoquímicos a partir de cultivo de células en la suspensión de Nerium oleander.

Torres, K. 1989. Tissue Culture Techniques Horticultural Crops. AVI book.

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., y Balsiev, H. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Pontífice Universidad Católica del Ecuador.

Alonso M. 2002. Biotecnología aplicada a mejora de *Pelargonium*.

Daniel, M. 2006. Medicinal Plants: chemistry and properties. Sience Publishers.

Razdan, M. 2004. Plant Tissue Culture, Science Publishers, 2003.

Rodríguez, M. 2004. Personal de Limpieza de Centros Sanitarios. Mad S.L.

Campbell, N. 2001. Biología. Person.

Singh N. 1999. Medicinal and Aromatic Plants of Himachal Pradesh. Indus.

Narayanaswamy. 2008. Plant Cell and Tissue Culture. Tata McGraw-Hill.

Cruzat, R. 2010. Resultados y lecciones de propagación *in vitro* en la especies ornamentales.

Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Mundi-Prensa

Weaver R. 2004. Botany section. Triology, 43: 1-13.

Kumar, S. 2009. Plant Tissue Culture. APH.

Syngenta. 2011. Amistar Top ficha técnica.

Avalos, A. y Pérez E. 2009. Metabolismo secundario de plantas.

Cara, M. Santos, M. Carreto, F. y Alcázar, M. 2012. Efecto fungicida del sulfato de cobre.

Davey, M. y Anthony, P. 2010. Plant Tissue Culture Essential Methods. Wiley-blackwell.

Orozco, F. Hoyos, R. y Arias, M. 2002, Cultivo de células vegetales en biorreactores: Un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. Medellín. 55: 73-95.

Jhonson, M. y Croteau, R. Biosynthesis of ascaridole: Iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1:54-66.

Milivojevic, S. Mitrovic, A. y Culafic, L. 2005. Somatic embryogenesis in *Chenopodium*

- rubrum* and *Chenopodium murale* in vitro. Springer. 49:35-39.
- George, E. Hall, M. y De Klerk, G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer.
- Corio, M. Chapuis, L. y Delbecque, J. 1998. Biotechnology in Agriculture and Forestry 41: Medicinal and Aromatic plants. Springer.
- Jaramillo, B. Duarte, E. y Delgado, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. Plantas Medicinales. 17:54-64.
- Soza, J. Solar, C. y Depallens, D. Efecto del cppu y thidiazuron sobre la calidad y condición en cosecha y poscosecha.
- Abdelnour, A. y Escalant, J. 1994. Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Orton.
- Hegazy, A. y Farrag, H. Allelopathic potencial of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seeding growth of some cultivated and weed plants.
- Jardim, C. Jham, G. Dhingra, D. y Freire, M. 2008. Composition and antifungal activity of essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides*. Springer. 44:378-379.
- Gerge, E. Puttock, D y George, H. 1987. Plant Culture Media. Volume 1. Exegetics.
- Baran, T. y Ghosh, B. 2005. Plant Tissue Culture: Basic and Applied. Orion.
- González, J. y Gómez, R. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Volumen 1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1998.
- Hurtado, J. y Gómez, R. 2011. Diseño experimental.
- Dixon, R. y González, R. 1994. Plant Cell Culture. University Press.
- Trigiano y Gray. 2005. Plant Tissue Culture. Development and Biotechnology Press.
- Nabila A. Tasneem, M. y Hassan, A. 1992. Secondary metabolites of *Chenopodium* species. Journal of the Chemical Society of Pakistan. 4:70-82.
- Barranco, L. Gómez, R. Reyes, M. Pérez, L. Freire, M. y Herrera, I. 2009. Efecto de la densidad del inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriónicas en el cultivar híbrido de banano fhia-18 (musa spp aab). Revista Colombiana de Biotecnología. 2:40-47.
- Gupta, D. y Ibaraki, I. 2006. Plant Tissue Culture Engineering. Springer.
- Neuman, K. y Imani, A. 2009. Plant Cell and Tissue Culture Tool in Biotecnology. Springer.
- Eisa, S. Koyro, H. Kogel, K. y Imani, J. 2005. Induction of Somatic Embryogenesis in Cultured Cells of *Chenopodium quinoa*.
- Taji, A. Kumar, P. y Lakshmanan, P. 2002. *In Vitro* Plant Breeding. Food Products Press.
- Dodds, J. y Lorin, R. 1995. Experiments in Plants Tissue Culture. Cambridge University Press.
- Blair, S. y Madrigal, B. 2005. Plantas Antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana. Universidad de Antioquía.
- Pari, W. Jaroslav, Z. Vera, F. y Melo, I. 1993. Antifungal Terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*.
- Saito, K. y Mizukami, H. 2005. Plant-Biotecnology and Transgenic Plants. Marcel Dekker.

