

PROPAGACIÓN POR SEGMENTOS NODALES DE LENTEJILLA (*LEPIDIUM VIRGINICUM* L.) EN CONDICIONES IN VITRO

¹ Candelaria Juárez Cayetano, Karly_cande@hotmail.com

² Mariana Miranda Arámbula, mmirandaa@ipn.mx

³ Aarón Comunidad Villa, acv_comunidad@hotmail.com

RESUMEN

Lepidium virginicum, es una arvense de gran importancia medicinal, utilizada para tratar diversas afecciones en la salud humana, como el cáncer de colon. El presente trabajo tuvo como objetivo propagar a *Lepidium virginicum* por medio de segmentos nodales en condiciones in vitro, utilizando medio MS en fase sólida, complementada con cisteína. Se utilizaron segmentos nodales de plantas elite. Para la desinfestación, se realizaron dos protocolos con variaciones en la concentración y tiempo de inmersión, en el primero se utilizó etanol al 10% durante 10 minutos; posteriormente se aplicó hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% con 2 gotas de tween al 20 % durante 5 minutos en constante agitación y, finalmente con etanol al 10% por 10 minutos. En el segundo protocolo, se utilizó etanol al 15% durante 5 minutos, hipoclorito de sodio al 15 % durante 3 minutos y tween 20 al 100% durante 5 minutos. Se evaluó el tiempo de proliferación en corte longitudinal y transversal, se compararon los perfiles de *Bachcharis salicifolia* y *Lepidium virginicum* por medio de cromatografía en capa fina. Se obtuvo desarrollo de nódulos a los 4 días de cultivo; con un rango de entre 6 a 12 hojas por cada brote, los protocolos establecidos fueron eficientes debido a que no hubo contaminación. Los segmentos de corte longitudinal presentaron proliferación a partir del día 4, a diferencia del corte transversal que presentó brotación a los 6 días de cultivo, varias muestras presentaron enraizamiento y floración in vitro. Se concluye que el medio MS adicionado con cisteína, y la aplicación del corte longitudinal generaron mayor número de brotación de nódulos en menor tiempo; a diferencia de otros investigadores, quienes han obtenido resultados después de 15 días. Asimismo, los tratamientos de desinfestación fueron eficientes, y respecto al perfil cromatográfico, las dos especies podrían compartir compuestos químicos.

ABSTRACT

Lepidium virginicum, is an weed of great medicinal importance, used to treat various conditions in human health, such as colon cancer. The objective of this work was to propagate *Lepidium virginicum* through nodal segments under in vitro conditions, using solid phase MS medium, supplemented with cysteine. Nodal segments from elite plants were used. For the disinfection, two protocols were carried out with variations in the concentration and immersion time during, in the first one 10% ethanol was obtained for 10 minutes; Subsequently, 5% sodium hypochlorite (NaClO) was applied with 2 drops of 20% tween for 5 minutes under constant pressure and, finally, with 10% ethanol for 10 minutes. In the second protocol, 15% ethanol was obtained for 5 minutes, 15% sodium hypochlorite for 3 minutes, and 100% tween 20 for 5 minutes. Deterioration time in longitudinal and cross sections was evaluated, the profiles of *Bachcharis salicifolia* and *Lepidium virginicum* were compared by means of thin layer chromatography. Nodule development was obtained after 4 days of culture; With a range of between 6 to 12

PALABRAS CLAVE

Asepsia
Fitorreguladores
Medio cultural
Propagación

KEYWORDS

Asepsis
Phytohormones
Culture medium
Propagation

¹ Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla/estudiante de Licenciatura.

² Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada IPN/docente-investigadora.

³ Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla /docente-investigador.

leaves per shoot, the protocols were efficient because there was no contamination. The longitudinal cut segments appeared from day 4, unlike the cross section that appeared budding on the 6th day of culture, several samples appeared rooting and flowering in vitro. It is concluded that the MS medium added with cysteine, and the application of the longitudinal cut generated a greater number of nodule sprouting in less time; unlike other researchers, who have obtained results after 15 days. Likewise, the disinfestation treatments were efficient, and regarding the chromatographic profile, the two species could share chemical compounds.

I. INTRODUCCIÓN

En México las plantas medicinales representan patrimonio cultural, destacando su utilidad hasta el día de hoy, como el principal recurso terapéutico para tratar diversos malestares relacionados con la salud humana (Ávila et al., 2016). De esta forma, son una alternativa para disminuir la utilización de medicamentos farmacéuticos, debido a que sus efectos secundarios son menores (Heisler et al., 2015).

Actualmente, las plantas medicinales constituyen un amplio campo de investigación enfocada principalmente a sus propiedades medicinales, estudios de los principios activos, denominados metabolitos secundarios (SEMARNAT, 2021); asimismo, existe la necesidad de propagar, preservar y aplicar técnicas recientes, utilizando avances biotecnológicos para el desarrollo de nuevas investigaciones que generen nuevos beneficios en el área de la medicina (Camacho-Escobar et al., 2020).

En este sentido, *Lepidium virginicum* es una arvense medicinal que, en estudios recientes, han demostrado función protectora contra algunos componentes carcinogénicos (Martínez, 2021); trata problemas renales, afecciones de la piel, diabetes, fitoterapia y además inhibe el crecimiento de algunos protozoos como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, que son los principales causantes de la diarrea en la población humana (Brucato et al., 2014). Por ser una planta con diversas propiedades biológicas, los científicos demandan cantidad de órganos vegetales para proseguir con el desarrollo de nuevos estudios.

Por otra parte, a falta de conocimiento y confianza de las propiedades medicinales de *L. virginicum*, la ha llevado al desinterés en la sociedad provocando que este expuesta a perder sus propiedades biológicas (Camacho-Escobar et al., 2020), especialmente porque son plantas que enfrentan un alto grado de presión antropogénica y por la competencia que existe con otras plantas por diferentes factores fisicoquímicos (Mora, 2008).

Adicionalmente, se considera necesario incluir estudios de variabilidad genética, conservación in situ o ex situ, evaluaciones de cultivo con respecto a requerimientos de siembra, rendimiento de principios activos, y la certificación del material que ingresa en el mercado (Brucato et al., 2014).

Aunado a lo anterior, se puede analizar el impacto ecológico, económico y cultural que tendría el establecer técnicas para su propagación, entre los cuales su aprovechamiento influye en el estudio de nuevos componentes para la industria farmacológica, en el sentido ecológico, las arvenses permiten buena cobertura del suelo y evitan la erosión (Rojas y Ramírez, 2013). En el aspecto cultural, se pueden preservar los conocimientos tradicionales del uso de las plantas medicinales y dentro del impacto ambiental, se pretende establecer sistemas biológicos con el fin de poder responder lo que demanda el desarrollo sustentable y el trabajo científico con plantas potenciales, asimismo, es de vital importancia para la protección de la biodiversidad del país (Rosales et al., 2019).

Para solucionar estas limitaciones, la biotecnología emplea técnicas como el cultivo de tejidos vegetales, considerada como la alternativa para aumentar el porcentaje de propagación mediante la siembra de semillas, cultivo de segmentos nodales, hojas, raíces y otras partes vegetales para conseguir propagación masiva de plantas idénticas al progenitor en poco tiempo (González et al., 2021), esta técnica se basa en el cultivo de tejidos o células vegetales, en medios nutritivos adecuados para la especie, bajo condiciones asépticas y para evitar la presencia de microorganismos; permitiendo el desarrollo de plantas enteras a partir de explantes (Acosta, 2015).

Aunado a lo anterior, el objetivo del presente trabajo de investigación fue propagar la especie de *L. virginicum*, por medio de segmentos nodales en condiciones in vitro, utilizando medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) con fitorreguladores de crecimiento, así como seleccionar la planta elite, aplicar protocolos de desinfestación, realizar tipos cortes longitudinales y transversales, realizar cromatografía en capa fina; comparando *Lepidium virginicum* y *Baccharis salicifolia*, a su vez, se analizaron los parámetros morfométricos de las plántulas obtenidas.

II. METODOLOGÍA

La presente investigación, se realizó durante el periodo febrero-abril del 2022 en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA), se encuentra situado en la Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tetlatlahuca, Tlaxcala, México. Con coordenadas a una longitud de 98°21'58.36"W, latitud 19°16'52.21"N. Tiene una temperatura media anual de 14°C, la temperatura máxima promedio es alrededor de 25°C entre los meses de abril y mayo, la temperatura mínima promedio es de 1.5°C en el mes de enero.

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue preparado con 500 ml de agua desionizada estéril y se le agregó 1.1 gL⁻¹ de medio Murashige y Skoog (MS), 0.0025 gL⁻¹ de cisteína, suplementado con 7.6 gL⁻¹ de sacarosa y se ajustó el pH a 5.8, posteriormente se le agregó 1.1 gL⁻¹ de phytigel, finalmente se puso en la parrilla de agitación magnética para homogeneizarlo con 0.5 gL⁻¹ de Poly (vinylpolypyrrolidone) para disolverlo completamente.

Después de preparar el medio, fue vertido en 20 frascos de vidrio con 20 mL a cada uno. Posteriormente, fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a una presión de 15 lb (126.5 °C). El material de cristal, pinzas y agua fue esterilizado de manera independientemente durante 30 minutos a 10 lb de presión (115.5 °C).

Colecta de material biológico

Se seleccionaron plántulas con las mejores características vegetativas, con una altura aproximadamente de 35 cm. Posteriormente, se colectaron las zonas meristemáticas de *L. virginicum* de aproximadamente 10-12 cm de longitud. Después, las varetas fueron llevadas al laboratorio para aplicarles un pretratamiento con agua desionizada y jabón comercial.

Desinfestación de segmentos nodales

Las varetas fueron desinfestadas superficialmente dentro de la campana de flujo laminar. Para ello, se realizaron 3 enjuagues con agua desionizada estéril, enseguida se les agregó etanol al 10%, se mantuvo en constante agitación durante 10 minutos, y fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada estéril. Luego se les agregó hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% con 2 gotas de tween al 20% durante 5 minutos en constante agitación y fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada estéril, posterior a ello, se realizó un último lavado con etanol al 10% durante 10 minutos y se realizaron los enjuagues. Este primer protocolo se realizó el 31 de febrero del 2022. Posteriormente, el segundo protocolo se realizó el 04 de marzo del 2022.

Enseguida, las varetas fueron colocadas en una caja petri para proceder al corte de los segmentos, utilizando pinza y bisturí No. 4, los segmentos nodales tenían una longitud aproximada de 0.8 a 1.0 cm con cortes terminales longitudinal y transversal. Con respecto al corte longitudinal, fueron cortados del centro del segmento nodal para dividirlo en dos partes iguales con presencia de zonas meristemáticas.

Establecimiento de cultivo

En todo momento de la siembra, las pinzas fueron desinfectadas con etanol al 90°, se procuró que el segmento-medio estuvieran en contacto. Al término de la siembra, los frascos fueron sellados con clean pack y se colocaron en la cámara de germinación, a un rango de temperatura de 22°C.

Cromatografía en capa fina en fase normal

Se utilizaron extractos completos de *Bachcharis salicifolia* y *Lepidium virginicum* ya evaporados con un rotavapor, posteriormente fueron resuspendidos con dicloro metano metanol (DCM: MeOH) al 1:1 hasta que se disolvieron completamente las dos muestras en recipientes independientes.

Posteriormente, en placas de silica gel en fase normal, se aplicaron 4μ aproximadamente de cada muestra, enumerándolos como carril 1: *B. salicifolia* y carril 2: *L. virginicum*. A continuación, la placa fue colocada en una cámara de vidrio, se agregaron 2 mililitros de sistema móvil, compuesto por: 1.4 mililitros de DCM y 0.6 mililitros de MeOH. Se dejó realizar el recorrido hasta el 90% de la placa, posteriormente la placa fue extraída y se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente ser revelados con luz U.V. a una longitud de 266nm y 254nm

III. RESULTADOS

Desinfestación

En cuanto a la desinfestación, *Lepidium virginicum*, todavía no se tienen reportes en la literatura, sobre una metodología aséptica aplicada para segmentos nodales. Por lo que, se establecieron dos protocolos de desinfestación: el primero consistió en un lavado con etanol al 10% durante 10 minutos, seguidamente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% con 2 gotas de tween al 20% y el último lavado fue con etanol al 10% por 10 minutos; en el segundo protocolo se utilizó etanol al 15% durante 5 min, después con NaClO al 15% por 3 minutos y el último lavado solo fue con tween al 20% durante 5 minutos. Ambos protocolos resultaron exitosos, no hubo presencia de patógenos, ni de contaminación.

Aunado a lo anterior, Osuna et al. (2006) realizaron desinfestación similar al protocolo establecido. El en cual utilizaron 50 gr de semillas de *L. virginicum*, fueron lavados superficialmente con etanol al 70% durante 30 segundos, posteriormente

con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.33% durante 3 minutos y después de cada lavado fue enjuagado con agua desionizada estéril. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en la presente investigación, debido a que se obtuvo un 100% de semillas germinadas libres de patógenos, sin embargo, en el presente estudio se realizó con segmentos nodales.

Así mismo, Bhasin et al. (2015), reportan una efectiva desinfección de entrenudos, con la especie *L. sativum*, utilizando bavistina y cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0.1 % (p/v) durante 5 minutos, seguido de alcohol al 70% durante 1 minuto y luego fueron enjuagados tres veces en agua destilada estéril.

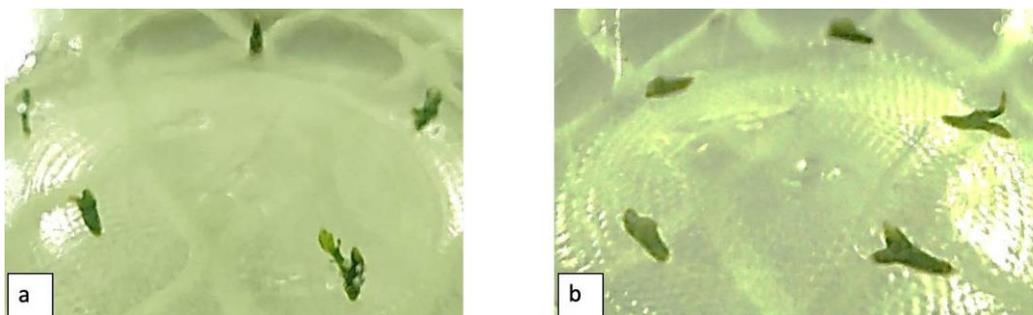
A diferencia de lo realizado en la presente investigación;

Brucato et al. (2006), utilizaron un fungicida de uso comercial, donde asperjaron plántulas de *L. virginicum* con Horticol® (10 mg L⁻¹), por cuatro días, durante dos semanas, posteriormente, fueron utilizadas para realizar cultivo in vitro por medio de microesquejes. Al aplicar esta metodología, algunos explantes presentaron clorosis y perdieron su capacidad de respuesta.

En lo que respecta a los protocolos de desinfección, llevados a cabo en el presente estudio, mostraron gran variación con respuesta a la brotación de nudos, el tratamiento testigo retraso de manera significativa los brotes, en ambos no hubo presencia de contaminación (Figura 1).

Figura 1.

Segmentos nodales de *L. virginicum*, con el protocolo de control para la desinfección superficial a los 6 días de cultivo. a) corte longitudinal, b) corte transversal.



Tipo corte

En esta fase, los segmentos nodales fueron obtenidos a partir de yemas apicales, cada segmento tuvo una longitud de 0.7 a 1.0 centímetros. Se realizaron dos tipos de corte; para los segmentos de *L. virginicum*: longitudinal en las áreas terminales del segmento y cortes transversales por toda la sección. Con el corte longitudinal se logró mayor proliferación, con incremento gran número de brotes por explante durante 4 días (Figura 2). Debido a que facilitó el contacto directo del explante con el medio de cultivo en solo una dirección, permitiendo la absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento.

Mientras que los segmentos nodales, aplicando corte transversal, proliferaron lentamente, después de 4 días (Figura 3). Mroginski et al. (2004), afirman que el tamaño y la zona utilizada influye en la regeneración, debido a que, si es tomado de una porción meristemática hay mayor proliferación de células, lo cual quedó demostrado al realizar la presente investigación.

Sin embargo, es preciso destacar que, hasta la fecha no se ha estudiado la respuesta de tipos de corte aplicados en cultivo in vitro para la familia Brassicaceae.

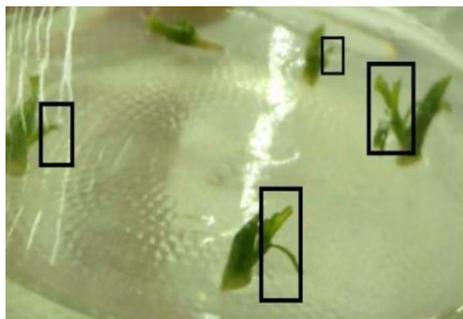


Figura 2.
Segmentos nodales, con corte longitudinal a partir de los 4 días. Se observa mayor proliferación de brotes.

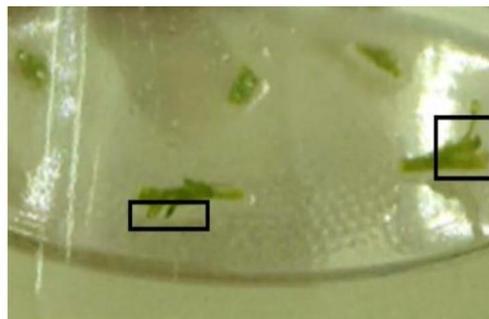


Figura 3.
Segmentos nodales con corte transversal, a partir de los 4 días. Se observa menor proliferación de brotes.

Proliferación de nódulos

La respuesta a la proliferación de brotes por nódulos, indicó que en el medio sólido utilizado con Murashige y Skoog (MS) al 100%, adicionado con 0.0025 gL^{-1} de cisteína, se obtuvo un promedio desarrollo de 66.6 % en donde 10 de cada 15 segmentos nodales proliferaron de manera efectiva a partir de los 4 días del cultivo (Figura 4 y 5).

Los segmentos cultivados respondieron en menor tiempo, pero se obtuvo escasa cantidad de proliferación, a diferencia de los resultados obtenidos por Osuna et al. (2006), donde realizó inducción morfogénica de cotiledones y yemas apicales de la especie de *L. virginicum*, obteniendo brotación a partir de los 15 días de cultivo; dentro de dicho estudio se utilizó MS al 100% suplementado con ácido indol-3-acético (AIA) 0.1 gL^{-1} y cinetina (CN) 3 gL^{-1} , donde 9 de cada 10 explantes desarrollaron brotación.

Por otra parte, en un trabajo de investigación realizado por Tapia et al. (2001) realizaron inducción morfogénica de explantes de hipocótilo de *L. virginicum*, obteniendo el 93% de formación de brotes a los 90 días de cultivo. En el cual utilizaron medio MS adicionado con ácido indol butírico (IBA) 3 gL^{-1} . Dicho estudio mostro diferencia, respecto a los días de brotación del presente trabajo realizado.

Sin embargo, Brucato et al. (2014) efectuaron micropropagación de *L. virginicum* por medio de microesquejes y

tallos, en medio MS modificado con 3 gL^{-1} de 6-bencilaminopurina (BA) y 4 gL^{-1} de BA, en donde obtuvieron resultados escasos, consecuencia de factores químicos y ambientales relacionado con la propagación in vitro.

Así mismo Bhasin et al. (2015) reportó la micropropagación por medio de entrenudos, ápices y cotiledones de *L. sativum*, utilizando medio MS, combinado con IAA 2.0 gL^{-1} y BAP 5.0 gL^{-1} o 2.0 gL^{-1} . Es preciso mencionar que, en la investigación realizada se obtuvo el 100% de efectividad en brotes. El rango de días por brote de ápice fue de 15 a 25 días, hojas cotiledóneas de 15 a 29 días y entrenudos fue de 38 a 45 días.

Mientras tanto Brucato et al. (2006), obtuvieron mayor proliferación de *L. virginicum*, en cultivo de microesquejes, por medio MS adicionado con 1 mL^{-1} de BA, con un rango de brotación de 15 a 30 días. Reportaron que la adición de una auxina junto con esta citoquinina disminuye la formación de los mismos.

Por otra parte, el medio utilizado resulto afectivo para que las plántulas presentaran un excelente desarrollo vegetativo en menos días (Figura 6), a diferencia de otros trabajos realizados, que muestran gran cantidad de proliferación con un rango de 15 a 90 días. Considerando el número de proliferaciones, sería indispensable realizar gran cantidad de unidades experimentales para obtener mayor proliferación en menos tiempo.

Figura 4.

Proliferación de brotes a los 8 días de cultivo (corte transversal) con un rango de 6 a 7 hojas.

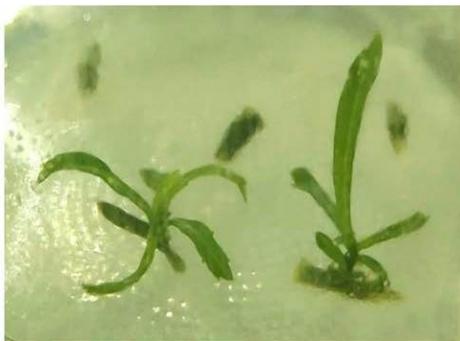


Figura 5.

Proliferación de brotes a los 8 días de cultivo (corte longitudinal) con un rango de 7 a 12 hojas.



Figura 6.

Desarrollo vegetativo de brotes a los 15 días de cultivo. a) corte longitudinal, con floración. b) corte transversal, sin flores.



Floración

La presencia de flores de *L. virginicum*, ocurrió a los 12 días dentro de los frascos de cultivo. De los cuales 10 segmentos nodales presentaron floración (Figura 7). Durante el tiempo de estudios se registraron dos frascos con floración, el primero presentó 6 flores y el segundo de 9 flores. Resultados similares obtuvo Osuna et al. (2016) al propagar plantas in vitro de *L. virginicum* y adaptarlos en sustrato, en condiciones de invernadero, presentaron flores con semillas viables a los 15 días.

Cabe mencionar que el trabajo reportado presentó floración in vitro, por lo cual se pudo visualizar el desarrollo de las mismas, así como el número de botones florales.

Figura 7.

Floración a los 12 días de cultivo, principalmente en segmentos de corte longitudinal de la especie de *L. virginicum*.



Enraizamiento

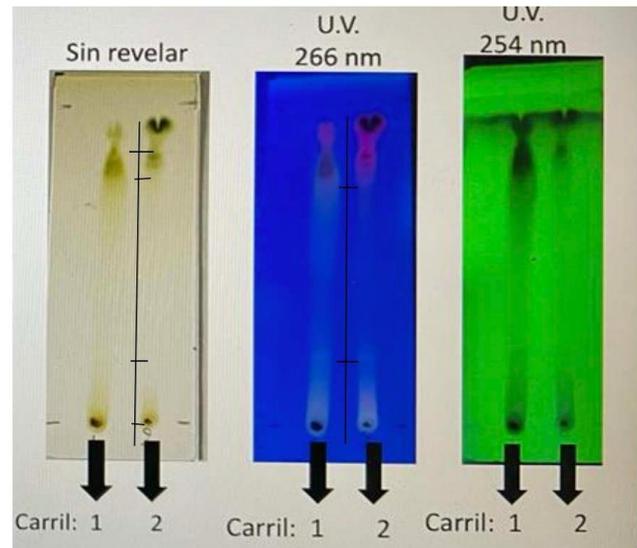
Respecto al enraizamiento, el primer tratamiento realizado permitió el desarrollo de raíces a los 12 días de cultivo, sin embargo el segundo tratamiento retardó el enraizamiento. Resultados similares obtuvieron Osuna et al. (2006), al sembrar brotes con medio MS complementado con ácido indolbutírico (IBA) 14.76 gL^{-1} , obteniendo raíces a los 15 días. Por otra parte, Tapia et al. (2001), indujeron enraizamiento de *L. virginicum* a los 150 días de cultivo utilizando medio MS con IBA 3 gL^{-1} . Lo cual indica que el medio utilizado en la investigación, resultó ser más eficiente debido a que no se utilizó un tratamiento para la inducción de raíces, así como también se obtuvieron en menor tiempo.

Cromatografía en capa fina (Fase normal).

Al revelar la placa con luz ultravioleta (U.V.), a una longitud de 266 nm se pudieron visualizar bandas de color rosa en menor proporción del carril 1 de *Bachharis salicifolia* y en el carril 2 de *L. virginicum*, se pudo observar el color rosa, con mayor intensidad. Al revelarlos a 254 nm de la luz U.V. Se visualizaron coloraciones variables al café en mayor cantidad en el carril 1 de *Bachharis salicifolia* y en el carril 2 de *L. virginicum* hubo menor presencia de coloración (Figura 8). Se visualizó poca variación de coloraciones de las dos especies, indicando que ambas especies pueden llegar a compartir compuestos, alguna con mayor concentración y otra en menor proporción. Comparando la coloración obtenida en el trabajo de Martínez (2021) realizado con extractos de *L. virginicum*; el color café, representó la presencia de esteroides.

Figura 8.

Visualización en luz U.V. carril 1: *Bachharis salicifolia* y carril 2: *Lepidium virginicum*, resuspendidos con dicloro metano metanol (DCM: MeOH).



IV. CONCLUSIONES

De acuerdo al medio utilizado, para la inducción de segmentos nodales a partir de Murashige y Skoog (MS) complementado con cisteína utilizando 0.0025 gL^{-1} , fue eficiente con respecto a la proliferación de los nudos de los segmentos en cuatro días de cultivo, comparado a lo realizado por otros autores; con un rango de 10 a 15 segmentos, presentaron proliferación de nódulos de las unidades experimentales realizadas. Asimismo, presentaron de 6 a 12 hojas por cada brote

de *L. virginicum*. Por tal motivo, el uso de reguladores de crecimiento suele ser importante para el desarrollo vegetativo de plantas con diferentes tipos de interés y la utilización de antibióticos no es indispensable para todos los cultivos.

Por otra parte, el tipo de corte también influyó en la proliferación de brotes, debido a que se registraron y se compararon los días de proliferación en corte longitudinal y transversal. Hubo variación de dos días, respecto al corte longitudinal; llegó a presentar floración in vitro a los 13 días con un rango de 5 a 9 botones por cada inflorescencia y a los 15 días hubo presencia de desarrollo de raíces de *L. virginicum*.

En el presente estudio, se reportaron dos protocolos de desinfección con una diferencia de concentración y tiempo de inmersión de las sustancias utilizadas para los segmentos nodales en cultivo in vitro. Los protocolos resultaron eficientes, debido a que no hubo presencia de contaminación o algún tipo de patógeno que pudiera afectar a la especie *L. virginicum*. Comparando los dos protocolos, el primero, permitió el desarrollo vegetativo a los 4 días y el segundo retrasó la proliferación de nódulos por 2 días de diferencia. Lo anterior, podría ser utilizado para el estudio de otras especies.

Respecto a la cromatografía en capa fina, *B. salicifolia* y *L. virginicum*, comparten ciertos componentes, mismos que pueden caracterizarlos por ser plantas silvestres.

Finalmente, es importante mencionar los retos afrontados en la investigación durante la pandemia, en los cuales se trabajó con tiempo limitado dentro de los laboratorios para evitar la concentración de estudiantes y docentes, así como a través de un sistema híbrido que consistió en trabajar algunos días en laboratorios y otros en línea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J. A. (2015). Embriogénesis somática en café (*Coffea canephora* y *Coffea arabica*) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. Carrera de Biología. Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Ecuador. 65 páginas.
- Ávila, M., García S., Sepúlveda A. y Godínez M. (2016). Plantas medicinales en dos poblados del municipio de San Martín de las Pirámides, estado de México. *Polibotánica*. Núm. 42. 215-245 páginas. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-27682016000200215&script=sci_abstract
- Bhasin, P., Bansal D., Grewal A. y R. Sehrawat A. (2015). Rapid Micropropagation of *Lepidium sativum* L. - A Medicinal Herb for Folklore Remedies. *Journal of Pharmacy Research*. 9(7). 480-483 pages.
- Brucato, G., Graziella M., Trujillo I. y Oropeza M. (2006). Micropropagación de *Lepidium virginicum* L. a partir de microesquejes. *Agronomía Trop.* 56 (4). 596-600 páginas.
- Brucato, M., Lindorf, H., Trujillo, I y Oropeza, M. (2014). Morfoanatomía comparada de hojas de *Lepidium virginicum* L. (Mastuerzo) Brassicaceae en condiciones in vivo e in vitro. *Acta Botánica Venezolana*. 37(1) Pp. 31-42 páginas.
- Camacho-Escobar M., Ramos-Ramos D., Ávila-Serrano N., Sánchez-Bernal E. y López-Garrido S. (2020). Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Terra Latinoamericana*. 3 (2). 443-453 páginas. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-57792020000300443&script=sci_abstract
- González, M., Caycedo C., Fernanda M., Flórez V. y Garzón M., (2021). Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento de coliflor (*Brassica oleraceae* L.) var. *Botrytis DC. Agronomía Colombiana* 25(1). 54-6 páginas.
- Heisler, E., Budó, M, Schimith, M., Badke, M., Ceolin, S., y Heck, R. (2015). Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. *Enfermería Global*. Núm. 29. 390-403 páginas. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: <https://repositorio.una.edu.ni/3186/1/nf70a367f.pdf>
- Mora, A. (2008). Acciones para la conservación de plantas: amenazas, retos y perspectivas. *La Granja*. 7(1). 21-24 páginas.
- Osuna, L., Tapia M., Figueroa O., Jiménez E., Garduño M., González M., Carranza P. y Cruz D. (2006). Micropropagation of *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), a plant with antiprotozoal activity. *In Vitro Cell. Developmental Biol., Plant*. Num. 42. 596-600 pages. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/20461629>
- Rojas, S. y Vibrans H. (2009). Catálogo de malezas de México: Familia Brassicaceae (crucifera). México. 227 páginas. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: <https://docplayer.es/95390968-Catalogo-de-malezas-de-mexico-familia-brassicaceae-cruciferae-sonia-rojas-heike-vibrans.html>
- Rosales-López, Arnáez-Serrano, Moreira-González, Garro-Monge, Agüero-Hernández, Jiménez-Quesada, Abdelnour-Esquivel, Calvo-Castro. (2019). Investigaciones en plantas con potencial bioactivo. *Tecnología en Marcha*. Núm. 32. 12-21 páginas.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2021). Plantas medicinales de México. México. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>
- Tapia M., González M. y Osuna L. (2001). Efecto antiprotozoario de la planta mexicana propagada in vitro *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae). Centro de Investigación Biomédica del Sur. Morelos, México. 1 página. Consultado el 17 de enero del 2022. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/CXII-13.pdf

